












DIETARY FOOD SUPPLEMENT CONTAINING NATURAL CYCLOOXYGENASE INHIBITORS

Patent number: WO0115553
Publication date: 2001-03-08
Inventor: NAIR MURALEEDHARAN G (US); WANG HAIBO (US); DEWITT DAVID L (US); KREMPIN DAVID W (US); QIAN YONG (US); MODY DIPAK K (US)
Applicant: UNIV MICHIGAN (US); AMWAY CORP (US); NAIR MURALEEDHARAN G (US); WANG HAIBO (US); DEWITT DAVID L (US); KREMPIN DAVID W (US); QIAN YONG (US); MODY DIPAK K (US)
Classification:
- international: A23L1/30; A23L1/30; (IPC1-7): A23L1/30; A61K35/78; C07H17/065
- european: A23L1/30B; A61K35/78
Application number: WO2000US23423 20000825
Priority number(s): US19990151278P 19990827; US19990151280P 19990827

Also published as:

 WO0115553 (A)
 WO0115553 (A)

Cited documents:

 WO0033824
 US4376781
 US4258055
 US4083779
 US4925690
 US4211577
 XP002137469
 XP000971680
 XP000971709
less <<

Report a data error he

Abstract of WO0115553

The present invention describes food supplements that contain one or more fruit extracts useful for pain relief and anti-inflammation. The food supplements may be used to inhibit inflammation mediated by cyclooxygenase and more particularly by cyclooxygenase-2.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

③

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成18年1月5日(2006.1.5)

【公表番号】特表2003-508415(P2003-508415A)

【公表日】平成15年3月4日(2003.3.4)

【出願番号】特願2001-519778(P2001-519778)

【国際特許分類】

A 6 1 K	31/7048	(2006.01)
A 2 3 L	1/30	(2006.01)
A 6 1 K	9/06	(2006.01)
A 6 1 K	9/08	(2006.01)
A 6 1 K	9/14	(2006.01)
A 6 1 K	9/20	(2006.01)
A 6 1 K	9/48	(2006.01)
A 6 1 K	36/18	(2006.01)
A 6 1 K	36/73	(2006.01)
A 6 1 K	36/75	(2006.01)
A 6 1 P	1/00	(2006.01)
A 6 1 P	11/06	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
A 6 1 P	19/02	(2006.01)
A 6 1 P	25/04	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/08	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)

【F 1】

A 6 1 K	31/7048	
A 2 3 L	1/30	B
A 6 1 K	9/06	
A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	9/20	
A 6 1 K	9/48	
A 6 1 K	35/78	C
A 6 1 K	35/78	H
A 6 1 K	35/78	K
A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	43/00	1 1 1

【手続補正書】

【提出日】平成17年9月27日(2005.9.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗炎症性を有する食物サプリメントであって、

a. 抗炎症活性が天然果実に見られる該抗炎症活性より大きいアントシアニン強化フルーツエキスであって、前記フルーツエキスが、スイートチェリー、タルトチェリー、アセロラチェリー、プラム、ビルベリー、ブラックベリー、スグリ、チョークベリー、ブルーベリー、ストロベリー、クランベリー、ボイゼンベリー、グレープ、ラズベリー、エルダーベリー、及びその混合物からなる群より選ばれた2種以上の果実に由来し、かつ前記フルーツエキスが、シクロオキシゲナーゼ1 (COX-1) 阻害活性よりも大きいシクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) 阻害活性を提供する、フルーツエキス、及び

b. 薬学的に許容しうる希釈剤又は賦形剤、
を含むことを特徴とする、食物サプリメント。

【請求項2】 前記2種以上の果物の1つが、エルダーベリーである請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項3】 COX-2阻害活性とCOX-1阻害活性の比が約1.1:1～約25:1である、請求項1又は2に記載の食物サプリメント。

【請求項4】 前記COX-2阻害活性が、ペオニジン、シアニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジン、ペツニジン、マルビジン、ケンフェロール、ヘスペリジン、ゲンチオデルフィン、プラチコニン、シネラリン、それらのグリコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれたアントシアニンによって仲介される、請求項1～3のいずれかに記載の食物サプリメント。

【請求項5】 該フルーツエキスが、1種以上のアントシアニンを該エキスの少なくとも約10重量%の量で含有している、請求項1～4のいずれかに記載の食物サプリメント。

【請求項6】 該フルーツエキスが、1種以上のシアニジンのグリコシド誘導体を含有している、請求項3記載の食物サプリメント。

【請求項7】 ゲル、カプセル、タブレット、シロップ、飲料又は粉末に処方される、請求項1～6のいずれかに記載の食物サプリメント。

【請求項8】 5 mg～100 mgの全アントシアニンを含有する単一剤形に処方される、請求項7に記載の食物サプリメント。

【請求項9】 20 mg～70 mgの全アントシアニンを含有する単一剤形に処方される、請求項7に記載の食物サプリメント。

【請求項10】 該抗炎症活性が、天然果実の該抗炎症活性の約2～約100倍である、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項11】 抗炎症性を有する植物又はエキスを更に含んでいる、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項12】 COX-2を阻害する薬剤の製造におけるアントシアニン含有エキスの使用であって、COX-1の阻害の方がCOX-2の阻害より少ないように、少なくとも1種のアントシアニンが、そのアグリコン形に加水分解されていることを特徴とする、使用。

【請求項13】 細胞との接触によるその細胞におけるCOX-2活性を阻害する薬剤の製造におけるフルーツエキスの使用であって、前記フルーツエキスが、スイートチェリー、タルトチェリー、アセロラチェリー、プラム、ビルベリー、ブラックベリー、スグリ、チョークベリー、ブルーベリー、ストロベリー、クランベリー、ボイゼンベリー、グレープ、ラズベリー、エルダーベリー、及びその混合物からなる群より選ばれた2種以上の果実に由来し、かつ天然果実に見られる該抗炎症活性より大きい抗炎症活性を有することを特徴とする、使用。

【請求項14】 該細胞が哺乳動物細胞である、請求項13記載の使用。

【請求項15】 該細胞がヒト細胞である、請求項14記載の使用。

【請求項 16】 該細胞を試験管内で該フルーツエキスと接触させる、請求項 13～15 のいずれかに記載の使用。

【請求項 17】 該細胞を生体内で接触させる、請求項 13～15 のいずれかに記載の使用。

【請求項 18】 動物又はヒトに投与することにより前記動物又はヒトにおける炎症応答を治療する薬剤の製造における組成物の使用であって、前記組成物が、

a. 果実由来の乾燥エキスであって、該エキ스가、天然果実に見られる該抗炎症活性より 2～100 倍大きい抗炎症活性を有する乾燥エキス；及び

b. 薬学的に許容しうる希釈剤又は賦形剤、を含むことを特徴とする、使用。

【請求項 19】 該炎症応答が、関節炎、疼痛、アレルギー疹、炎症性腸症候群、及び喘息からなる群より選ばれる、請求項 18 記載の使用。

【請求項 20】 該フルーツエキスが、ペオニジン、シアニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジン、ベツニジン、マルビジン、ケンフェロール、ヘスペリジン、ゲンチオデルフィン、プラチコニン、シネラリン、それらのグリコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれたアントシアニンを含有している、請求項 18 又は 19 に記載の使用。

【請求項 21】 該 COX-2 が選択的に阻害されるように該アントシアニンが生体内で加水分解される、請求項 18～20 のいずれかに記載の使用。

【請求項 22】 アントシアニン含有植物からアントシアニンを濃縮する方法であって、

a. 該植物と水の混合物をホモジナイズして、ペオニジン、シアニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジン、ベツニジン、マルビジン、ケンフェロール、ヘスペリジン、ゲンチオデルフィン、プラチコニン、シネラリン、それらのグリコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれたアントシアニンを 1 種以上含有する水溶液と、固形分とを形成する段階；

b. 該固形分を該溶液から分離する段階；

c. 該水溶液を、分子量区分が約 100,000～約 1,000,000 の範囲内にある限外ろ過膜を通過させて上澄みを得る段階；

d. 該上澄みを分子量区分が約 1,000～約 10,000 の範囲内にある逆浸透膜を通過させて該アントシアニンを多く含んだ保持物質を得る段階；

e. 該保持物質を集める段階；及び

f. 該保持物質を約 80℃ より低い温度で乾燥する段階、を含む、前記方法。

【請求項 23】 集めた該保持物質に流れ調整剤を添加して混合物を形成し、乾燥する該段階が該混合液を噴霧乾燥して粉末を形成することにより達成される、請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】 該粉末と賦形剤とを合わせて食物サプリメントを得る、請求項 23 記載の方法。

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2003-508415
(P2003-508415A)

(43) 公表日 平成15年3月4日(2003.3.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
A 6 1 K 31/7048		A 6 1 K 31/7048	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	B 4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/06		A 6 1 K 9/06	4 C 0 8 6
9/08		9/08	4 C 0 8 8
9/14		9/14	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-519778(P2001-519778)
(86) (22) 出願日 平成12年8月25日(2000.8.25)
(85) 翻訳文提出日 平成14年2月27日(2002.2.27)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 2 3 4 2 3
(87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 1 5 5 5 3
(87) 国際公開日 平成13年3月8日(2001.3.8)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 5 1 , 2 7 8
(32) 優先日 平成11年8月27日(1999.8.27)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 5 1 , 2 8 0
(32) 優先日 平成11年8月27日(1999.8.27)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ミシガン ステイト ユニヴァーシティー
アメリカ合衆国 ミシガン州 48824 イ
ースト ランシング アドミニストレイシ
ョン ビルディング 238
(71) 出願人 アルティコア インコーポレイテッド
アメリカ合衆国, ミシガン州 49355-
0001, エイダ, イースト, フルトン スト
リート 7575
(72) 発明者 ネイア ムラリードハーラン ジー
アメリカ合衆国 ミシガン州 48864 オ
ークモス イースト サンウィンド ドラ
イヴ 3943
(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外10名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 天然シクロオキシゲナーゼ阻害剤を含有する食物サプリメント

(57) 【要約】

本発明は、疼痛軽減や抗炎症に有効なフルーツエキスを1種以上含む食物サプリメントを記載している。該食物サプリメントは、シクロオキシゲナーゼ、特にシクロオキシゲナーゼ2によって仲介される炎症を阻害するために用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗炎症性を有する食物サプリメントであって、

- a. 抗炎症活性が天然果実に見られる該抗炎症活性より大きいアントシアニン強化フルーツエキス、及び
- b. 薬学的に許容しうる希釈剤又は賦形剤、を含む、前記食物サプリメント。

【請求項2】 該フルーツエキスが、スイートチェリー、タルトチェリー、アセロラチェリー、プラム、ビルベリー、ブラックベリー、スグリ、チョークベリー、ブルーベリー、ストロベリー、クランベリー、ボイゼンベリー、グレープ、ラズベリー、エルダーベリー、及びその混合物からなる群より選ばれた果実由来である、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項3】 該エキスの該抗炎症活性がシクロオキシゲナーゼの阻害によって仲介される、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項4】 該エキ스가、シクロオキシゲナーゼ1 (COX-1) 阻害活性よりシクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) 阻害活性の方が大きい、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項5】 該エキ스가、シクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) 阻害活性よりシクロオキシゲナーゼ1 (COX-1) 阻害活性の方が大きい、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項6】 COX-2阻害活性対COX-1阻害活性の比が約1:1～約25:1である、請求項4記載の食物サプリメント。

【請求項7】 該抗炎症阻害活性が、ペオニジン、シアニジン、ペラルゴニン、デルフィニン、ペツニン、マルビジン、ケンフェロール、ヘスペリジン、ゲンチオデルフィン、プラチコニン、シネラリン、それらのグリコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれたアントシアニンによって仲介される、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項8】 該フルーツエキスが、1種以上のアントシアニンを該エキスの少なくとも約10質量%の量で含有している、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項9】 該フルーツエキ스가、シアニジン、そのグリコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれたアントシアニンを含有している、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項10】 ゲル、カプセル、タブレット、シロップ、飲料又は粉末に処方される、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項11】 該抗炎症活性が、天然果実の該抗炎症活性の約2～約100倍である、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項12】 抗炎症活性を有する植物又はエキスを更に含んでいる、請求項1記載の食物サプリメント。

【請求項13】 ヒトにおいてCOX-2を阻害する方法であって、COX-1の阻害の方がCOX-2の阻害より少ないようにアントシアニンがアグリコン形に加水分解されるアントシアニン含有エキスを供給する段階を含む、前記方法。

【請求項14】 細胞においてCOX-2活性を阻害する方法であって、該細胞と、スイートチェリー、タルトチェリー、アセロラチェリー、プラム、ビルベリー、ブラックベリー、スグリ、チョークベリー、ブルーベリー、ストロベリー、クランベリー、ボイゼンベリー、グレープ、ラズベリー、エルダーベリー、及びその混合物からなる群より選ばれた抗炎症活性が天然果実に見られる該抗炎症活性より大きいフルーツエキスとを接触させる段階を含む、前記方法。

【請求項15】 該細胞が哺乳動物細胞である、請求項14記載の方法。

【請求項16】 該細胞がヒト細胞である、請求項15記載の方法。

【請求項17】 該細胞を試験管内で該フルーツエキスと接触させる、請求項14記載の方法。

【請求項18】 該細胞を生体内で接触させる、請求項14記載の方法。

【請求項19】 動物において炎症応答を治療する方法であって、

a. 抗炎症活性が天然果実に見られる該抗炎症活性より大きいフルーツエキス、及び

b. 薬学的に許容しうる希釈剤又は賦形剤、

を含む組成物を該動物に投与する段階を含む、前記方法。

【請求項20】 該炎症応答が、関節炎、疼痛、アレルギー疹、炎症性腸症

候群、及び喘息からなる群より選ばれる、請求項19記載の方法。

【請求項21】 該フルーツエキ스가、ペオニジン、シアニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジン、ペツニジン、マルビジン、ケンフェロール、ヘスペリジン、ゲンチオデルフィン、プラチコニン、シネラリン、それらのグリコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれたアントシアニンを含有している、請求項19記載の方法。

【請求項22】 該COX-2が選択的に阻害されるように該アントシアニンが生体内で加水分解される、請求項21記載の方法。

【請求項23】 アントシアニン含有植物からアントシアニンを濃縮する方法であって、

- a. 該植物と水の混合物をホモジナイズしてペオニジン、シアニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジン、ペツニジン、マルビジン、ケンフェロール、ヘスペリジン、ゲンチオデルフィン、プラチコニン、シネラリン、それらのグリコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれたアントシアニンを1種以上含有する水溶液と、固形分を形成する段階、
- b. 該固形分を該溶液から分離する段階、
- c. 該水溶液を、分子量区分が約100,000～約1,000,000の範囲内にある限外ろ過膜を通過させて上澄みを得る段階、
- d. 該上澄みを分子量区分が約1,000～約10,000の範囲内にある逆浸透膜を通過させて該アントシアニンを多く含んだ保持物質を得る段階、
- e. 該保持物質を集める段階、及び
- f. 該保持物質を約80℃より低い温度で乾燥する段階、を含む、前記方法。

【請求項24】 集めた該保持物質に流れ調整剤を添加して混合物を形成し、乾燥する該段階が該混合液を噴霧乾燥して粉末を形成することにより達成される、請求項23記載の方法。

【請求項25】 該粉末と賦形剤とを合わせて食物サプリメントを得る、請求項24記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、1999年8月27日出願の『植物からのフラボノイド類を濃縮する方法』と称する米国仮出願第60/151,280号に対する優先権を主張する。本出願は、1999年8月27日出願の米国仮出願第60/151,278号にも関連し、この明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする。

【0002】

背景

本発明は、疼痛又は炎症の軽減、また、疼痛又は炎症伝達に関係する生化学経路の阻害に有効である食物サプリメントに関する。これらの食物サプリメントは、フラボノイド類、特にある種のアントシアニンを含有している。

今日、多くの消費者は、日常生活で感じる様々な症状の応急処置のために合成医薬品に対する天然代替物を探し求めている。従って、最近ではセントジョーンズウォルト、イチヨウ、ニンジン等のような天然物質を含有する食物サプリメントが様々な効果のために市販されている。しかしながら、いままでに、非ステロイド系抗炎症剤（『NSAID』）と等価な疼痛及び/又は炎症の軽減を与える天然物質を含有する製品は得られていないと思われる。

現在、疼痛や炎症は、アスピリン、イブプロフェン（Motrin（登録商標）、Advil（登録商標））、又はNSAIDとして一般に知られる他の類似物質の使用によって共通して治療されている。炎症は、一部には、機械的、熱、化学的、細菌、又は他の傷害に応答してホストが遊離するプロスタグランジンとして知られる種類の化合物によって伝達される（Moncadaら、Handbook of Exp. Pharm. Vol 50-1, Springer Verlag, pp 588-616, 1978; Samuelsson, Science, 220: 568-575, 1983; Daviesら、Ann. Rev. Immunol. 2:335-357, 1984）。プロスタグランジンの合成は、偏在するミクロソーム酵素の複合体によって段階的方法で達成される。この生合成経路の第1酵素はプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼである。この酵素は、当該技術においては脂肪酸シクロオキシゲナーゼとも呼ばれている。この酵素の2つのイソ型がそれぞれシクロオキシゲナーゼ-1（COX-1）と

シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) として知られている (Smith, Am. J. Physiol., 268:F181-F191, 1992)。

【0003】

アスピリンのような物質はプロスタグランジンの産生、即ち、疼痛又は炎症を阻止するが、胃の問題及び/又は潰瘍を引き起こすことがある。これらの問題に取り組むために、アスピリン、イブプロフェン、又は他の類似物質と関連がある問題の一部が完全に排除されない場合には弱められることを期待して特定の疼痛経路を標的にする薬剤が開発された。そのような薬剤は、Celebrex(登録商標)であり、特定の疼痛経路を明らかに標的にし、よって、アスピリンのような物質に伴う欠点がない。特に、NSAIDは、ヒトアラキドン酸/プロスタグランジン経路における酵素を阻害することによりプロスタグランジンの産生を阻止する。しかしながら、Celebrex(登録商標)のような薬剤は、COX-1とCOX-2を区別し、標準のNSAIDに伴う副作用がないものとしてうたわれている。

上記のように、多くの消費者は、合成薬剤より天然物質を好んで用いている。従って、好ましくは優先的にCOX-2酵素を阻害する天然の薬理学的に許容しうる抗炎症組成物が求められている。本発明は、疼痛の軽減、抗炎症活性、及び/又はCOX-2の優先阻害を与える未変性活性画分を有するスノキ属の植物材料の1種以上からのエキスを含有する食物サプリメントを得ることによりその要求に応えるものである。該サプリメントは、該画分の量を植物材料から得られた果汁に乾燥質量で存在する画分の割合を著しく超える他の成分の乾燥質量の割合で含有している。一般的には、該活性画分は、フラボノイド類、特にアントシアニンを含んでいる。

【0004】

発明の要約

本発明は、疼痛軽減や抗炎症に有効なフルーツエキスを1種以上含有する食物サプリメントを記載している。食物サプリメントは、シクロオキシゲナーゼ、特にシクロオキシゲナーゼ-2によって仲介される炎症を阻止するために用いることができる。特に、本発明は、抗炎症活性が天然フルーツに見られる該抗炎症活性より大きいフラボノイドを多く含んだフルーツエキス、及び薬学的に許容しうる

希釈剤又は賦形剤を含んでいる、抗炎症活性を有する食物サプリメントを提供する。

個々の実施態様においては、フルーツは、スイートチェリー、タルトチェリー、アセロラチェリー、プラム、ビルベリー、ブラックベリー、スグリ、チョークベリー、ブルーベリー、ストロベリー、クランベリー、ボイゼンベリー、グレープ、ラズベリー、エルダーベリー、及びその混合物からなる群より選ばれる。ある実施態様においては、エキスの抗炎症活性は、シクロオキシゲナーゼの阻害によって仲介される。具体的な実施態様においては、エキスのシクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) 阻害活性は、シクロオキシゲナーゼ1 (COX-1) 阻害活性より大きい。好適実施態様においては、COX-2阻害活性とCOX-1阻害活性の比は、約1:1~約25:1である。これは比率の例示範囲であり、これらの2つの数値間の比率が特に企図されていることは当然のことである。

【0005】

ある実施態様においては、抗炎症活性は、シアニジン-3-グルコシド、シアニジン-3-グルコシルルチノシド、シアニジン-3-ゲンチビオシド、シアニジン-3-ルチノシド、ペオニジン-3-ルチノシド、ペオニジン、シアニジン、シアニジン-3-ソホロシド、ペラルゴニジン、デルフィニジン、ペツニジン、マルビジン、ケンフェロール、ヘスペリジン、ゲンチオデルフィン、プラチコニン、シネラリン、及びその混合物からなる群より選ばれたフラボノイドによって仲介される。特に企図された実施態様においては、フルーツエキスは、エルダーベリーフルーツエキス、チョークベリーフルーツエキス、タルトチェリーフルーツエキス又はその混合物である。他の好適実施態様においては、食物サプリメントは、エルダーベリーエキス、ビルベリーエキス、及びチェリーエキス、好ましくはタルトチェリーエキスを含んでいる。

本発明は、また、アントシアニンの加水分解形のアントシアニジンがアントシアニンと比べて高COX阻害活性を示すという所見に基づいている。従って、本発明のサプリメントは、上記フラボノイド類（アントシアニン）をサプリメントに取り込み、アントシアニンが生体内で加水分解されてCOX阻害活性を得ることを企図している。

【0006】

食物サプリメントは、ゲル、カプセル、タブレット、シロップ、飲料又は粉末に処方することができる。そのような製剤の製造方法は、当業者に周知である。他の態様においては、食物サプリメントは、更に、ビタミン、ミネラル、補酵素、繊維、ハーブエキス又はその組合わせからなる群より選ばれた追加の添加剤を含むことができる。特に好ましいハーブエキスは、ジンジャーエキスやボスウェリアエキスを含んでいる。ビタミンは、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンB₁₂、リボフラビン、ナイアシン、パントテン酸、チアミン、コリン、葉酸、ビオチン、ビタミンK、又はビタミンCからなる群より選ぶことができる。ミネラルは、コバルト、銅、鉄、マンガン、亜鉛、セレン又はその組合わせからなる群より選ぶことができる。

個々の実施態様においては、抗炎症活性は、天然果実の抗炎症活性の約2～約100倍である。他の実施態様においては、食物サプリメントの疼痛軽減特性は、アスピリンの疼痛軽減特性より大きい。

また、抗炎症活性が天然果実に見られる抗炎症活性より大きいビルベリーエキス、チェリーエキス、エルダーベリーフルーツエキス、又はその混合物より選ばれたフルーツエキスを含んでいる抗炎症性を有する食物サプリメントが企図される。具体的な実施態様においては、食物サプリメントは、更に、チョークベリーフルーツエキス又は上で確認された他のフルーツエキスを含んでいる。

【0007】

また、細胞においてCOX-2活性を阻害する方法であって、該細胞と、抗炎症活性が天然フルーツに見られる抗炎症活性より大きいビルベリーエキス、チェリーエキス、エルダーベリーフルーツエキス、及びその混合物の群より選ばれたフルーツエキスとを接触させる段階を含む、前記方法が提供される。個々の実施態様は、更に、該細胞と該チョークベリーフルーツエキス又は上で確認された他のフルーツエキスとを接触させる段階を含んでいる。特に好ましい実施態様においては、該エルダーベリーフルーツエキスと該チョークベリーフルーツエキスが同じ組成物中にある。他の実施態様においては、該エルダーベリーフルーツエキスと該チョークベリーフルーツエキスは、別個の組成物中にある。本発明のある態様

は、該細胞が哺乳動物細胞であることを企図している。他の実施態様は、該細胞がヒト細胞であることを企図している。具体的な実施態様は、該細胞と該フルーツエキスとを試験管内で接触させる。他の実施態様は、該細胞を生体内で接触させることを企図している。好適態様においては、該方法は、ゲル、カプセル、タブレット、シロップ、飲料又は粉末に処方されたサプリメントを使用する。

本発明の他の態様は、動物において炎症応答を治療する方法であって、抗炎症活性が天然果実に見られる抗炎症活性より大きいフルーツエキス；及び薬学的に許容しうる希釈剤又は賦形剤を含む組成物を該動物に投与する段階を含む、前記方法を提供する。

【0008】

個々の実施態様においては、該炎症応答は、関節炎、疼痛、アレルギー疹、炎症性腸症候群、及び喘息からなる群より選ぶことができる。勿論、これらが例示炎症疾患であり、本食物サプリメントが炎症応答から生じる疾病の優れた薬草治療剤を与えることができることが企図される。本サプリメントは、ゲル、カプセル、タブレット、シロップ、飲料又は粉末の形であってもよい。

本明細書に記載される食物サプリメントは、単独で又は他の抗炎症治療剤と併用して用いられる場合に有効であることは理解されるべきである。他の治療剤と併用して用いられる実施態様においては、本方法は、更に、サリチル酸塩、グルココルチコイド、パラアミノフェノール誘導体、オピオイド、インドメタシン、スリンダク、フェナム酸塩、プロピオン酸誘導体及びオキシカムからなる群より選ばれた抗炎症剤を該動物に投与する段階を企図している。

本発明の他の実施態様は、疼痛に苦しんでいる生物に摂取又は適用した場合に疼痛が軽減される、エルダーベリーフルーツ、チェリー（タルトチェリーを含む）、ビルベリー、チョークベリーフルーツ、又は本明細書に記載される他のアントシアニン含有フルーツを含むアントシアニン含有フルーツのエキスを含む栄養剤を含んでいる。特に、疼痛は、関節炎、月経痛、頭痛、虫刺症又はアレルギー疹の痛みであってもよい。

【0009】

本発明の他の目的は、抗炎症活性が天然果実の該抗炎症活性の約2～約100倍で

あるサプリメントを提供することである。例えば、該サプリメントの抗炎症活性が天然果実に見られる該抗炎症活性より大きいエルダーベリーフルーツエキスを含有し得る。

本発明の他の目的は、細胞においてCOX-2活性を阻害する方法であって、該細胞と抗炎症活性が天然フルーツに見られる該抗炎症活性より大きいエルダーベリーフルーツエキスとを接触させることによる前記方法を提供することである。一般的には、本目的は、動物において炎症応答を治療する方法であって、抗炎症活性が天然果実に見られる該抗炎症活性より大きいフルーツエキス；及び薬学的に許容しうる希釈剤又は賦形剤を含む組成物を該動物に投与する段階を含む、前記方法を企図している。

本発明の他の目的、特徴及び利点は、次の詳細な説明から明かになるであろう。しかしながら、詳細な説明及び個々の実施例は、本発明の好適実施態様を示しており、単に例示によって示されているので、本発明の真意と範囲内で様々な変更と修正がこの詳細な説明から当業者に明かになるであろう。

特にことわらない限り、詳細な説明と特許請求の範囲に用いられる%はすべて質量%である。

【0010】

発明の詳細な説明

プロスタグランジン (PGE₂、PGD₂、PGF₂、PGI₂及び他の関連化合物) は、脂肪酸の代謝から誘導される異種グループの自己分泌ホルモンとパラ分泌ホルモンである。細胞において細胞膜リン脂質の分解から誘導される炭素数20の脂肪酸のアラキドン酸から要求に応じて生合成されるように貯蔵されない天然に存在するエイコサノイド (プロスタグランジン、トロンボキサン又はロイコトリエン) のファミリーに属している。正常な場合には、エイコサノイドは低レベルで産生され、異なった種類の細胞内では非常に異なってしまう多くの異種細胞機能の重要な伝達物質として働いている。しかしながら、プロスタグランジンは、病態生理学に重要な役割を果たしている。特に、少なくとも一部には、損傷した細胞においてプロスタグランジンが過剰生産されることにより炎症の開始も維持もされる。炎症においてプロスタグランジンが果たす中心的な役割は、多くの炎症の病態の

治療に最も有効であるアスピリン様非ステロイド系抗炎症剤 (NSAID) がプロスタグランジン合成を阻害することによりすべて作用しているという事実によって強調される。残念ながら、これらの薬剤の使用は、正常な生理学の維持に必要とされる自己分泌機能とパラ分泌機能の欠除に苦しむことになる正常細胞において望ましくないプロスタグランジンの減少から生じる副作用 (胃腸出血、潰瘍、腎不全等) によってしばしば制限される。特に、炎症を起こした細胞におけるプロスタグランジンの減少を他の細胞におけるプロスタグランジン産生を変化させずに達成することにより作用する新規な薬剤の開発は、将来の疼痛炎症治療の目標である。

【0011】

シクロオキシゲナーゼ反応は、プロスタグランジン合成経路の第1段階である。プロスタグランジンG/H合成活性を有する酵素 (PGHS) は、アラキドン酸をエンドペルオキシドPGG₂に変換し、次にPGH₂に分解する (2つの反応が単一酵素で行われる)。PGH₂は、1種以上のプロスタグランジンシンターゼ (PGE₂シンターゼ、PGD₂シンターゼ等) によって代謝されてトロンボキサン、TXA₂を含む最後の『2系列』プロスタグランジン、PGE₂、PGD₂、PGF₂、PGI₂等を生成する。第1段階 (PGHS) は、プロスタグランジン合成を律速する段階である。それだけで、PGHS 仲介反応は、抗炎症剤作用の主な標的であり、炎症におけるプロスタグランジンの過剰生産を制限する (所望の治療目標) とともに炎症を起こしていない細胞におけるプロスタグランジンの正常の産生を減少させる (望ましくない副作用を生じる) NSAID (アスピリン、アセトミノフェン、イブプロフェン、ナプロキセン、インドメタシン) の活性を説明することがPGHS活性の阻害である。

炎症に伴う異常な変化のほかに、実験条件下でプロスタグランジン産生に影響する他の多数の因子が既知である。これらには、成長因子、cAMP、腫瘍プロモーター、src活性化及びインターロイキン1又は2が含まれ、すべてが細胞PGHS活性全体を増大させる。副腎グルココルチコイドホルモンや関連した合成抗炎症ステロイドもプロスタグランジン合成を阻害するが、代謝作用部位ははっきりしていない。

【0012】

たいの非ステロイド系抗炎症剤の主要な、おそらく唯一の作用は、プロスタグランジンの生合成において第1始動段階として働くシクロオキシゲナーゼとして知られる酵素、プロスタグランジンG/Hシンターゼを阻害することである。

シクロオキシゲナーゼが2つのイソ型、COX-1とCOX-2で存在していることは十分に確立されている。構成的に表される形、COX-1は、徹底的に研究され、プロスタグランジン仲介生理作用の維持に関係していることが提唱されている。対照的に、COX-2、誘導型は、正常状態のもとでは無視できる量で存在するが、炎症症状のもとでは生体内で実質的に誘導される。COX-1とCOX-2が、異なる生理作用と病理作用の働きをすることは明らかである。

最も広く利用できるNSAIDは、両方のイソ型を無差別に阻害する非選択的シクロオキシゲナーゼ阻害剤である。酵素が2つの異なるイソ型をもつことが発見されてから選択的COX-2阻害剤が探究されてきた。最近、COX-2特異的阻害剤が開発されたが、副作用があることが示されている。炎症を治療する安全で効果的な方法が求められている。本発明は、その要求に応えるものである。

本発明は、COX-2活性を優先的に阻害しかつCOX-2によって仲介される炎症を改善するNSAIDに対する天然代替物を記載するものである。本発明は、ある種のフルーツエキスの抗炎症活性が天然果実に見られる抗炎症活性より大きいことを示している。この所見を利用して抗炎症活性が天然果実に見られる抗炎症活性より大きいフルーツエキス及び薬学的に許容しうる希釈剤又は賦形剤を含む食物サプリメントを提供する。言い換えると、本発明は、選択的にCOX-2を阻害する、アントシアニン含有植物、特に果実から得られたエキスを提供する。

【0013】

また、アントシアニン含有植物からのエキスは、COX-1の活性を選択的に阻害することができる。従って、本発明は、COX-1又はCOX-2の活性を選択的に阻害するアントシアニン含有植物のエキスから誘導されたアントシアニンを少なくとも1種含有する食物サプリメントを企図している。

特に、実施態様においては、エルダーベリーエキスとチョークベリーエキスが高抗炎症活性を有することがわかる。フルーツエキスのアントシアニン化合物（特に加水分解した）によって仲介されるこの抗炎症活性は、COX-1の阻害に比べ

てCOX-2の阻害が大きい。この所見を利用する方法と組成物は、下で更に詳述される。しかしながら、一般的に言えば、この実施態様のエキ스는、アントシアニン含有植物から選択され、COX、好ましくはCOX-2の活性を選択的に阻害する。哺乳動物がエキスを経口的に摂取する場合、存在するアントシアニンはCOXを阻害する対応するアントシアニンに生体内で加水分解されると考えられる。個々の実施態様においては、ある種の果実の抗炎症活性がCOX-1に比べてCOX-2に優先的であることがわかった。本発明の特に好ましい態様においては、抗炎症活性のCOX-2/COX-1比が約2:1～約25:1であるフルーツエキスを得ることが望ましい。ある実施態様においては、タルトチェリーエキスのCOX-2/COX-1比は約4.6:1であり、チョークベリーの比は約7.5:1であり、エルダーベリーの比は約10.1:1であることがわかった。実際に、ある態様においては、この抗炎症活性は、十分に認識されているCOX-2合成阻害剤のCelebrex(登録商標)の抗炎症活性より大きいものである。

【0014】

従って、チョークベリー、エルダーベリー、ビルベリー、タルトベリー又はその混合物が有益な抗炎症性を有することが企図される。個々の実施態様においては、これらのフルーツエキスの1種を含んでいる栄養サプリメントが企図される。また、2種以上のフルーツエキスを含む食物サプリメントも企図される。比較によって、COX-2特異的阻害活性を有するというCelebrex(登録商標)抗炎症薬剤のCOX-2/COX-1阻害活性比が7.0であることがわかった。

好適実施態様においては、栄養食物サプリメントは、約0.1%～約99%、好ましくは約5%～約95%、望ましくは約10%～約90%、更に好ましくは約30%～約90%のアントシアニン含有エキスを含んでいる。アントシアニン含有エキスの量は、上で確認されたアントシアニン含有フルーツエキス、及び他のアントシアニン含有植物エキスによって与えることができる。

この点では、単一剤形(即ち、単一のタブレット、カプセル、サービング(液体にしても固体にしても))は、約1 mg～約500 mgの全アントシアニン、好ましくは約5 mg～約100 mg、更に好ましくは約20 mg～約70 mgの全アントシアニンを含有する。現在好ましい製剤においては、約50 mgの全アントシアニンを含有す

るタブレット（単一剤形）が提供される。『全アントシアニン』という言葉は、単一剤形中に有するアントシアニンの全量を意味する。

本発明の食物サプリメントは、単一剤形の抗炎症有効成分の量を約0.1%～約99%、好ましくは約5%～約95%、望ましくは約10%～約90%、更に好ましくは約30%～約90%の範囲で与える。抗炎症有効成分は、アントシアニン含有植物、エキス又は抗炎症活性を与える植物又はエキス（例えば、ジンジャー、ボスウェリア）由来であってもよい。

【0015】

A. NSAIDに対する天然代替物としてのアントシアニン

植物に天然に見られる有益な植物化学物質を含有する食物サプリメントがますます求められてきている。これらの天然に存在する植物化学物質は、数種の異なるグループに分類し得る。重要なグループの1つは、フラボノイド類であり、これもいくつかのグループに分類することができる。フラボノイド類の重要なグループはアントシアニンである。アントシアニンは、チェリー（スイート、サワー（又はタルト））、アセロラチェリー、ブループラム、ビルベリー、ブラックベリー、スグリ、チョークベリー、ブルーベリー、ストロベリー、クランベリー、ボイゼンベリー、グレープ、ラズベリー、又はエルダーベリーのような赤色、青色、又は中間色をした花や果物に最も優勢である。本発明は、食物サプリメントに抗炎症活性を与えるためのアントシアニンの使用を記載している。

本発明によれば、アントシアニンは、アントシアニン含有植物のエキスから得られる。植物がアントシアニンを含有するかを求める方法は既知であるので、ここでは述べない。適切なアントシアニン含有植物の例としては、スイートチェリー、タルトチェリー、アセロラチェリー、プラム、ビルベリー、ブラックベリー、スグリ、チョークベリー、ブルーベリー、ストロベリー、クランベリー、ボイゼンベリー、グレープ、ラズベリー、エルダーベリー、及びその混合物からなる群より選ばれた果実が挙げられる。

【0016】

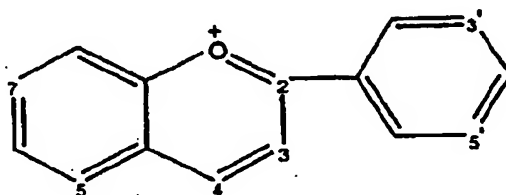
抗炎症活性を与えるのに用いることができるアントシアニンとしては、シアニジン-3-グルコシド；シアニジン-3-グルコシルルチノシド；シアニジン-3-ゲン

チビオシド；シアニジン-3-ルチノシド、シアニジン-3-サンブニグリン、シアニジン-3-サンブ-5-グルコシド、シアニジン-3-ガラクトシド、ペオニジン-3-ルチノシド、ペオニジン-3-グルコシド、ペオニジン-3-ガラクトシド、ペオニジン、シアニジン、シアニジン-3-ソホロシド、ペラルゴニジン、デルフィニジン、デルフィニジン-3-グルコシド、デルフィニジン-3-ガラクトシド、ペツニジン、ペツニジン-3-グルコシド、ペツニジン-3-ガラクトシド、マルビジン、マルビジン-3-アラビノシド、マルビジン-3-グルコシド、マルビジン-3-ガラクトシド、ケンフェロール、ヘスペリジン、ゲンチオデルフィン、プラチコニン、シネラリン等が含まれるがこれらに限定されない。

これらの物質の化学は、下記構造を有する2-フェニルベンゾピリリウム（フラビリウム）に基づいている。

【0017】

【化1】



【0018】

この基本式が2、3、4、5、7、3' 又は5' においてヒドロキシ基又はメトキシ基で置換される場合、得られた化合物はアントシアニンとして知られ、水不溶性であり、光に不安定であり、アルカリで急速に破壊され、よってほとんど植物には見られない。しかしながら、アントシアニンは、上記化合物の配糖体であり、安定であり、植物の葉、花又は果実に未変性物質として見られる。従って、アントシアニンは、加水分解されてアントシアニジン（アグリコン形）と糖を生じる。

天然に見られるアントシアニンの全体数は非常に大きく、多くのモノ、ジ及びトリサッカリドが3、5又は7位でグリコシル化されることができ、3位の糖もアシル化される（しばしばp-クマル酸で）ことができるからである。従って、具体的

な果実は、シアニジン、デルフィニジン、ペツニジン、ペラルゴニジン又はマルビジンの3,5-ジグルコシド、3-モノグルコシド、3-(6-O-p-クマリルグルコシド)-5-グルコシド又は3-(6-O-p-クマリルグルコシド)を含む20種以上のアントシアニンを有することができる。アントシアニンの色は、分子構造及び存在する媒質の物理化学的性質によって決定される。

【0019】

本発明によれば、エキ스는、ペオニジン、シアニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジン、ペツニジン、マルビジン、ケンフェロール、ヘスペリジン、ゲンチオデルフィン、プラチコニン、シネラリン、それらのグリコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれたアントシアニンを1種以上含有する。好適実施態様においては、アントシアニンは、シアニジン、ペオニジン、マルビジン、ペツニジン、デルフィニジン、それらのグルコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれる。

加水分解されたアントシアニン、アントシアニジンは、アントシアニンやそのグリコシド誘導体と比べてCOX阻害活性が大きいことがわかった。結果として、本発明は、NSAIDのような現在利用できるCOX阻害剤より有利であると思われる。アントシアニンは、COX阻害、特にCOX-1阻害があるとしてもほとんどないと思われる。従って、アントシアニン含有する食物サプリメントが摂取される場合には、胃腸（『GI』）管でCOX-1の阻害はほとんどなく、おそらく副作用が減少する。

【0020】

B. アントシアニンの抽出方法

当業者に既知のアントシアニンの抽出方法がいろいろある。これらの方法の一部は、例えば、米国特許第5,817,354号；同第5,200,186号；同第5,912,363号；同第4,211,577号；同第4,302,200号に記載されている（それぞれの明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする）。

米国特許第5,817,354号には、苦味の原因となる柑橘類産物からフラボノイド類を除去する方法が記載されている。該方法は、1種以上の苦味フラボノイド類を含有する液体とポリスチレンジビニルベンゼン樹脂とを接触させてフラボノイ

ド類を樹脂に結合する段階を含んでいる。一般的には、ポリスチレンジビニルベンゼン樹脂と接触させる前に遠心分離又は限外ろ過段階を用いている。次に、樹脂から溶離することによりフラボノイド類が収集され得る。この特許には、フラボノイド類を樹脂からどのように溶離(除去)し得るかが記載されてなく、Chandraら(J. Agric. Food Chem., 1062-64, Vol. 41, No. 7(1993))にはアントシアニンを溶離するためにエタノールの使用が記載されている。次に、溶離した溶液を減圧乾燥してエタノールが除去されている。

【0021】

米国特許第5,912,363号には、植物材料からプロアントシアニジンを抽出する方法が記載されている。該方法には、固体の植物材料の水性混合液を、任意により高圧と低酸素下で加熱する段階に続いて種々の分離、ろ過及び吸着段階、及び吸着したプロアントシアニジンの極性溶媒による溶離が必要である。この方法は、また、極性溶媒を該方法の溶離相への再構成及び再循環に従い、溶媒使用の減少とコスト効果の高いプロセスがもたらされる。

米国特許第4,211,577号には、不純な材料を処理して溶液中に異なるアントシアニンモノマー分子を確実にし、その溶液を限外ろ過膜に通過させて可溶性及び/又は濁った巨大分子、例えば、コロイド不純物を熟成、煙霧、及び沈降を生じる下流に保持し、液体又は粉末として更に濃縮する下流にアントシアニンモノマーを送ることによる植物アントシアニン色の抽出が記載されている。この方法で、果実固形分を、イオン化し、脱色し、色素分子のモノマー状態を確実にするために二酸化イオウ溶液で処理することができる(アントシアニンからクロモン2-及び4-スルホネートに変化する)。溶液を限外ろ過してペクチン、タンニン、タンパク質、その複合体等の巨大分子成分を上流に維持しつつアントシアニンを下流に送る。任意により、限外ろ過した溶液から二酸化イオウをストリッピングするとクロメンスルホネートから最初のアントシアニンが再生する。次に、アントシアニンは、高度に濃縮した液体に蒸発させることにより濃縮することができ、分子内にアシル基を有する不安定な色素は定温で制御された沈殿により除去されてもよい。

【0022】

米国特許第4,302,200号には、アントシアニンを含有する天然産物を亜硫酸イオン含有水溶液と85℃以上の温度で、天然産物と最初に接触している水溶液の亜硫酸含量がSO₂で少なくとも10,000 ppmに調整される30分以内に接触させることにより天然産物からアントシアニンを抽出する方法が記載されている。

米国特許第3,963,700号には、酒石酸アルカノール抽出に続いて酒石酸水素カリウムとして過剰量の酒石酸の制御された沈殿を用いてグレープ廃棄物のような植物材料からアントシアニンを回収する方法が記載されている。この特許には、更に、アントシアニンエキスを着色された人工グレープを調製するためのこれらのアントシアニンの使用が記載されている。

上記特許に記載された方法が本明細書に記載される抗炎症性のためにアントシアニンを生成するのに用いられることが企図される一方、本発明者らは天然源からアントシアニンを抽出する他の方法を開発した。

本方法は、望ましくない化学物質を用いずに植物からフラボノイド類を濃縮する方法に関する。方法には、1種以上のフラボノイド類を含有する溶液を限外ろ過膜に通過させて上澄みと保持物質を得る段階を含んでいる。次に、上澄みを逆浸透膜に通過させて保持物質と浸透物を得、次に逆浸透保持物質を集める。

【0023】

限外ろ過膜の分子量区分は、好ましくは約100,000～約1,000,000の範囲にある。逆浸透膜の分子量区分は、好ましくは約1,000～約10,000の範囲内にある。

集めた保持物質は、本発明に記載されるCOX-2阻害抗炎症性を有する。好適実施態様においては、食物サプリメントを得るために保持物質をこのように乾燥し、1種以上の賦形剤と混合することができる。

ここで、図1について説明する。図1は本発明の方法の実施態様を示すフローシートである。本実施態様によれば、植物源1、特にフラボノイド類を含有する果実、更に特にアントシアニン化合物を含有する果実を抽出法10で処理してエキス又は果汁2を得る。例えば、ケーキや果汁を得るために植物を搾汁操作又はねじプレス又はバググプレスのような搾る操作に供することができる。また、生の植物を粉碎、粉末又はバルク固形分から所望のフラボノイド類化合物の抽出と分離を容易にするために植物の表面積を増大させるプロセスに供することができる。

この分離を促進させるとともに所望のアントシアニン化合物の良好な最終回収を得るために、植物と抽出用溶媒3とを接触させてフラボノイド類（特にアントシアニン化合物）を多く含んだエキス（果汁）を得るとともにバルク固形分残渣又はケーキ4を形成することは望ましいことである。好ましくは、抽出用溶媒は、分離処理段階をできるだけ少なくするために水である。抽出段階は、慣用の抽出装置を用いて向流方式でバッチ、又は多重バッチ抽出を行うことができる。

【0024】

更に、所望のアントシアニン化合物の回収を高めるためにケーキを同様に抽出プロセスに供することができる。この抽出プロセス段階が行われる場合には、この段階からのエキスを前の段階からの果汁及び/又はエキス（果汁）と合わせることは望ましいことである。

果汁は、遠心分離機、スクリーン、プレス、又はフィルターのようなバルク分離装置を用いて既知の方法でケーキから分離することができる。限外ろ過の前に、バルク固形分を既知のバルク分離装置で液体から分離することが望ましい。例えば、遠心分離機、フィルター、スクリーン、プレス等を用いることができる。

その後、懸濁粒子と分子量が約200,000ダルトンより大きい高分子量コロイド成分を除去するために限外ろ過プロセス20が用いられる。限外ろ過膜は、管状型、毛管型、らせん型、中空繊維、又は他の適切な型であり得る。膜は、ポリスルホン、ポリアクリロニトリル、ポリエーテルスルホン、PVDF又は他の適切な材料であり得る。好ましくは、限外ろ過はクロスフローを用いて行われる。膜の分子量区分は、約20,000ダルトン～約300,000ダルトン、好ましくは約200,000ダルトンの範囲にあり得る。限外ろ過前にろ過がない場合には、許容しうるろ過速度が得られるように高分子量区分膜を用いることが好ましい。従って、限外ろ過段階の前に精密ろ過を組込むことが企図される。

【0025】

例えば、サイズが約0.01～約1マイクロメートルの範囲にある懸濁粒子を除去するためにマイクロフィルターを用いることができる。

限外ろ過は、約0.5～2.5MPa（5～25 bar）の圧力下で約20℃～約80℃の温度で行われ得る。この段階は、主に脂質、タンパク質及び類似コロイド、細胞断片、

デンプン等を除去し、ろ過速度の低下を招く膜の汚染がなく次のR0段階が行われ得るという利点がある。

限外ろ過段階によってアントシアニン化合物を多く含んだ浸透物5と望ましくない化合物を含有する保持物質7が得られる。フラボノイド類と所望のアントシアニン化合物の最終回収を高めるために、限外ろ過膜にジフィルトレート6を供給することができる。

限外ろ過浸透物5は、アントシアニン化合物を含むフラボノイド類を多く含んだ保持物質8、及びアントシアニン化合物を含む実質的にフラボノイド類を含まない浸透物10を得るために逆浸透30に供される。フラボノイド類と所望のアントシアニン化合物の最終回収を高めるために、ジフィルトレート9を限外ろ過膜に供給することができる。本発明のR0に用いられる膜は、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、セルロースアセテート、又はポリアミド膜であり得る。

【0026】

逆浸透は、約3～7MPa (30～70 bar) の圧力で約30℃～約80℃の温度で行うことができる。好ましくは、温度は約30℃～約45℃の範囲内に維持される。一般的には、逆浸透膜の分子量区分は、保持物質を得る約1,000～約10,000の範囲内、好ましくは約2,000である。

保持物質は、出発植物材料に見られるものより高い濃度の所望のアントシアニン化合物を含有する。保持物質は、溶液の形のままであってもよいが、水の一部を除去するために乾燥40により更に濃縮してもよく、粉末11を形成するために完全に乾燥してもよい。

濃縮した溶液が所望される場合、NaCl保持が90%より多い逆浸透膜の使用を含む慣用の手段によって水の一部を除去することができる。

噴霧乾燥が好ましい乾燥手段であるが、他の乾燥法、例えば、フラッシュ乾燥、凍結乾燥、流動床乾燥、リング乾燥、ミクロン乾燥、トレー乾燥、真空乾燥、高周波乾燥、又はマイクロ波乾燥もこの乾燥段階に用いられるように適合させることができる。

乾燥前に、マルトデキストリン（例えば、M100）、水酸化マグネシウム又は他の既知の流れ調整剤又は担体のような1種以上の流れ調整剤を添加することは望

ましいことである。保持物質中の固形分含量の約20～60質量%の量で流れ調整剤を添加することは望ましいことである。

【0027】

噴霧乾燥を用いる場合、保持物質の全固形分含量は、全スラリー質量に対して少なくとも約1%でなければならないが、少なくとも約20%～約35%の範囲内の高い全固形分含量が所望される。乾燥段階で除去されなければならない水の量が減少してくるので高い固形分含量レベルが望ましい。結果として、保持物質の固形分含量は、得ることができ、なお効率のよい処理条件を可能にする程度に高い。保持物質中の固形分含量の上限は、典型的には、逆浸透/ナノろ過段階で用いられる膜の操作中の束縛及び用いられる乾燥装置によって決定される。

保持物質の温度は重要ではない。一般的には約10～25℃の周囲温度が好ましい。高いスラリー温度が用いられ、これらはあるタイプの乾燥装置において望ましいものである。

慣用の噴霧乾燥装置を用いることができ、噴霧乾燥において当業者によく知られた操作手順がこのプロセスの噴霧乾燥段階に適用できる。ドライヤ（ドライヤガス）の出口温度は、普通は得られた粉末で得られる残留水分レベルを制御するために用いられる。噴霧乾燥プロセスにおいては、ドライヤの出口温度は、普通は約40～100℃の範囲内である。一般的には、所望されるアントシアニン化合物の分解の可能性をできるだけ少なくするために約80℃未満に出口温度を維持することが望ましい。対応するドライヤ入口温度は高く、普通は約90℃～約200℃の範囲内であるが、好ましくは約150℃未満である。

【0028】

乾燥操作から回収された産物は、典型的には、微粒状粉末の外観を有しかつ食物サプリメントとして用いるのに適した自由流動微粒状固体である。この点で、所望される1種以上のアントシアニン化合物を含有する得られた粉末は、食物サプリメントとして有効である。

果汁入り清涼飲料を調製するために用いることができる濃縮物12を得るために、例えば、濃縮機50によって逆浸透の浸透物を更に処理することができる。

勿論、上記は単に1つの方法であり、抗炎症活性が天然果実に見られる抗炎症

活性より大きいフルーツエキスを得るいずれの方法も本発明に関連して用いられることは理解されるべきである。

上記方法のいずれもが所望のアントシアニンを得るのに適しているが、本発明の製品に必要とされる一部又は全部に市販のエキスをを用いることができる。一例として、フォートワインのアルテミスインターナショナル、インディアナ州がアントシアニンと他のフラボノイド類を含有する果汁濃縮液と粉末を供給していることは既知である。市販品を用いる場合、エキス中のアントシアニン含量は、エキス製品の少なくとも10質量%であることが好ましい。

【0029】

C. アントシアニンの同定及び新規な抗炎症化合物

上記には、エキスが未精製果実より抗炎症活性が高いフルーツエキスから抗炎症活性を抽出する方法が記載されている。これらの教示を考えれば、フルーツエキスをそのような抗炎症活性を与える新規な化合物を含む精製組成物を得ることも可能である。本項は、そのような化合物を精製及び同定する一般的教示を与えることに関する。

一般的には、フルーツエキスは上記のように調製される。このフルーツエキスは、フラボノイド化合物の混合物を含み、その一部はCOX-2選択的活性を有し、その他はCOX-1選択的活性を有し、その他は広範囲スペクトルシクロオキシゲナーゼ阻害活性を有し、その他はシクロオキシゲナーゼ阻害の認めうるほどの阻害活性はないものである。

具体的なフルーツエキスが抗炎症活性を有することを、例えば、下記の分析又はCOX活性を測定するのに当業者に既知の他の等価な分析を用いて証明するとき、フルーツエキスの個々の成分を分離することは可能である。分離手法は、当業者に周知である。例えば、当業者は、個々のフラボノイド成分を分離するために薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、スーパークリティカルフロークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを用いることができる（クロマトグラフィー手法の概要についてはFreifelder, 物理生化学の生化学と分子生物学への応用, 2nd ed., W

m. Freeman & Co., ニューヨーク, N.Y., 1982を参照されたい)。

【0030】

分配クロマトグラフィーは、2相が相互に接触している場合や1相又は2相が溶質を構成している場合には、溶質がその2相間に配分されるという理論に基づいている。通常は、吸着剤と溶媒で充填されるカラムを用いる。溶質を含有する溶液をカラムの上部に加層する。次に、溶媒をカラムに通過させ、連続して溶質をカラム材料まで移動させることができる。次に、溶質を移動速度に基づいて集めることができる。2つの最も共通するタイプの分配クロマトグラフィーは、ろ紙クロマトグラフィーと薄層クロマトグラフィー (TLC) であり、共に吸着クロマトグラフィーと呼ばれる。いずれの場合も、マトリックスは結合した液体を含有している。他の分配クロマトグラフィーの例は、ガス液体クロマトグラフィーやゲルクロマトグラフィーである。

ろ紙クロマトグラフィーは、ろ紙の形のセルロースカラム上で行われる分配クロマトグラフィーの変形である。セルロースは、徹底的に乾燥したときでさえ多量の結合した水を含有している。分配は、結合した水と展開する溶媒間で生じる。用いられる溶媒は、しばしば水である。通常は、非常に少量の分離すべき溶液混合液をろ紙の上方に置き、乾燥する。毛管現象によって溶媒がろ紙に流れ、試料を溶解し、流れの向きに成分を移動させる。溶媒流れを上昇か又は降下させるのにペーパークロマトグラムを展開させることができる。最初の実験後に移動軸を90° 変化させることにより二次元分離が可能である。

【0031】

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、脂質を分離するために非常に一般的に用いられているので、本発明の好適実施態様と考えられる。TLCは、ろ紙クロマトグラフィーの利点を有するが、微細にし得るとともに均一層にし得る物質の使用が可能である。TLCにおいては、固定相は、ガラス又はプラスチック平板の表面上に一様に拡散した吸着剤層である。平板は、通常は、平板の周辺に沿って選択した高さにテープを置くことによりウェルをつくった後に、ゲルの表面に注ぐ吸着剤スラリーをつくることにより平板が作製される。吸着剤が乾燥した後、テープを取り除き、ろ紙クロマトグラフィーのろ紙のように平板を処理する。試料を

加え、平板を溶媒と接触させる。溶媒が平板の端にほとんど達するとすぐに、プレートを取り出し、乾燥する。蛍光、免疫学的同定、放射能の計数、又は種々の試薬表面に噴霧して色の変化が生じることによりスポットを同定し得る。

Petriら(1994)にビルベリーエキスからのアントシアニンのTLCが記載されている。この文献には、更に、アントシアニン物質の同定と確認に使用し得る分光光度法とクロマトグラフィー法が記載されている。

ガス液体クロマトグラフィー(GLC)においては、移動相は気体であり、固定相は管又はカラムの内部面か又は固体支持体に吸着される液体である。液体は、通常は、エーテルのような揮発性溶媒に溶解した固体として加えられる。揮発し得る試料であってもよい試料は、ヘリウム、アルゴン又は窒素のような不活性ガスとともに液体として導入され、加熱される。このガス状混合物が管を通過する。揮発した化合物は、分配係数にしたがって移動気相と固定液相間で再配分される。

【0032】

GLCの利点は、小分子の分離にある。感度と速度は非常に良好であり、速度は標準液体クロマトグラフィーの1000倍近い。非分解検出器を用いることにより、グラム量の材料を精製するためにGLCを分取用を使用し得る。

ゲルクロマトグラフィー、又は分子ふるいクロマトグラフィーは、分子サイズに基づく特殊な種類の分配クロマトグラフィーである。ゲルクロマトグラフィーの背後にある理論は、カラムが小さな孔を有する不活性物質の小さな粒子で調製され、サイズによっては孔の中又は孔の前後を通過するにつれて大きい分子を小さい分子から分離することである。粒子をつくる材料が分子を吸着しない限り、流速を決定する唯一の因子はサイズである。つまり、形が相対して一定である限り、サイズの小さい点で分子がカラムから溶離される。ゲルクロマトグラフィーは、分離がpH、イオン強度、温度等の他のすべての因子に依存しないことから異なるサイズの分子を分離するのにまさるものはない。また、ほとんど吸着せず、ゾーンが広がらず、溶離量が単純に分子量に関係する。

ゲルクロマトグラフィーのゲル材料は、通常は不規則な構造である三次元的な網目構造である。ゲルは、一般的には不活性であり、分析される材料と結合も反

応もせず、電荷をもたない架橋ポリマーからなる。ゲル内の充填された空間は、液体で充填され、この液体はほとんどのゲル容量を占めている。一般的なゲルは、デキストラン、アガロース又はポリアクリルアミドであり、水溶液として用いられる。

【0033】

高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) は、異常な分割のピークによる極めて急速な分離を特徴とする。これは、十分な流速を維持する非常に微細な粒子と高圧の使用によって達成される。分離は分程度で、又は長くても1時間で達成し得る。更に、粒子がそのように小さく稠密であり、ボイド容量が総容積の非常に小さな部分であることから非常に少量の試料しか必要とされない。また、バンドが狭いので試料をほとんど希釈しないことから試料の濃縮はほとんど必要ない。光双極子アレイ検出系によるHPLC設定は、ルチン又は他のケルセチン配糖体、フロリジン、及びある種のアントシアニンのようなフラボノイド類を研究するために用いられている (Paganga & Rice-Evans, FEBS Lett. 401(1):78-82, 1997)。逆相HPLC勾配法は、12のアントシアニンの分離と定量評価が記載されている (Petriら, Acta Pharm. Hung. 64(4) 117-122, 1994)。ケルセチン化合物もLairesらによって記載されたHPLC法を用いて確認することができる (Food Chem. Toxicol., 31(12) 989-994, 1993)。新規なフラボノイド類を確認同定するのにそのような方法を本発明に適合させることができることも企図される。

アフィニティークロマトグラフィーは、分離すべき物質と特異的に結合し得る分子間の特異的親和性に依存するクロマトグラフィー法である。これは、レセプターリガンド型相互作用である。カラム材料は、結合パートナーの一方を不溶性マトリックスに共有結合することにより合成される。カラム材料は、溶液からの物質を特異的に吸着し得るものである。分離は、条件を結合が起こらないものに変えることにより起こる (pH、イオン強度、温度等を変える)。

【0034】

マトリックスは、分子を有意な程度までは吸着せずかつ広範囲の化学的、物理的及び熱的安定性を有する物質でなければならない。リガンドは、結合特性に影響しないような方法で結合しなければならない。リガンドは、また、相対して強

固に結合しなければならない。また、試料又はリガンドを破壊させずに物質を分離することが可能でなければならない。最も一般的な形の1つは、検出すべき具体的な物質に対する抗体を用いる免疫親和性クロマトグラフィーである。

上記の手法を用いて分離されるアントシアニンの構造は、Saitoら (Phytochemistry 41(6) 1613-1620, 1996; Phytochemistry 43(6), 1365-1370, 1996); Take daら (Phytochemistry 36(3) 613-616, 1994)に記載されている質量スペクトルと NMRスペクトルを生成することにより同定し得る。NMR法は、更に、Teraharaら (BioSci. Biotech. Biochem., 58(7) 1324-1325, 1994); Nerdalら (Acta Chem. Sc and. 46(9) 872-876, 1992)に記載されている。Johansenら (Phytochemistry 30(12) 4137-4141, 1991)には、アントシアニンの分離のためにイオン交換樹脂、小滴向流クロマトグラフィー又はゲルろ過を含む種々の方法及び分離したアントシアニン化合物の確認のために化学分解、クロマトグラフィー又は分光法、特に同核又は異核二次元NMR法の続いての使用が記載されている。上記手法のいずれもが本明細書に記載されたフルーツエキスを分離及び精製して抗炎症活性に関与する個々の化合物を同定するために使用し得ることは当業者に明かである。

【0035】

D. 抗炎症活性を試験する分析

本発明においては、アントシアニン含有フルーツエキスが抗炎症活性を有することが記載されている。特に、そのエキ스가COX-1活性より優先的にCOX-2を阻害することが証明される。それだけでこれらのエキ스는、COX-2に選択的であるという点で伝統的なNSAIDに対して優れた代替物を与える。これらのエキ스는心臓発作、卒中、又は他の有害な心臓血管事象の傾向増大に関連しない天然エキスであることから最近開発されたCOX-2特異的『スーパーアスピリン』より更に有利である。

酵素を最大活性の50%まで阻害する阻害剤の濃度は、 IC_{50} 又は I_{50} と呼ばれる。 IC_{50} が小さくなるほど、対応する阻害剤が酵素阻害に強くなり又は効力が大きくなる。結果として、化合物が機能障害部位又は疾患部位に吸収、代謝、輸送され得る場合には、抗炎症や疼痛軽減サプリメント製剤に必要とされる阻害剤の量は少なくなる。

ある材料、化合物、又は植物濃縮物は、COX-1か又はCOX-2酵素を選択的に阻害することができる。これを、物質の選択性と呼ぶことができる。選択性は、 $1/50$ (COX-1) / $1/50$ (COX-2) の比の数値で表すことができる。比が1に等しい場合には、阻害剤はいずれのアイソザイムにも選択性がない。即ち、阻害剤は、COX-1とCOX-2酵素を同様に阻害する。比が1未満である場合には、阻害剤はCOX-1阻害に選択的である。比が1より大きい場合には、阻害剤はCOX-2阻害に選択的である。慢性の抗炎症性又は疼痛の軽減剤又はサプリメントについては、選択性が副作用に重要な役割を果たすことができる。副作用は、たいてい胃腸 (GI) 出血であり、プロスタグランジンがGI内膜で正常な機能をもつGI管に対するCOX-1酵素の阻害に起因する。

【0036】

選択性は、非ステロール抗炎症剤 (NSAID) において重要な課題である。NSAIDだけが、炎症部位と疼痛部位に対する吸収と輸送の予想された作用のほかに、GI管において構成的に示されるCOX-1酵素を阻害するとともにGI出血を引き起こし得る活性型をもっているからである。まだ証明されていないが、アントシアニン含有植物エキスのような天然産物は、非活性型と活性型があるので、GI管で副作用を引き起こすことができないことから有利である。吸収、代謝及び輸送の異なる機序が存在してもよい。非活性型 (糖とのグリコシド型) がCOX-1酵素を阻害せずにGI管に吸収又はそこを通過し得ることは可能である。結果として、GI管でCOX-1酵素によって生成されたプロスタグランジンの量は、正常又はGI内膜を維持するのに十分高い。吸収後、糖部分は切断され、活性型 (アグリコン型、アントシアニン) はCOX-2酵素が高いレベルで誘導される部位に輸送されるが、COX-1も同様に阻害される (しかし程度は小さい)。両酵素の部位での阻害は、抗炎症と疼痛軽減に非常に有効である。

本発明のある態様においては、具体的なフルーツエキス又はその成分が抗炎症活性を有するかを求めることが必要である。そのような活性は、当業者に周知である抗炎症分析を用いて測定することができる。プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ-1及び-2アイソザイムの使用は、具体的なエキスが適切な活性を有するかを安易に求めることができる。これらの分析によって、アラキドン

酸をプロスタグランジンに変換する酵素の能力が求められる。また、下記の免疫分析法を用いることができる。

【0037】

アラキドン酸やCOX-1、及びCOX-2酵素のミクロソーム懸濁液のような試薬は、当業者に容易に入手しうる（例えば、オックスフォードバイオメディカルリサーチ、オックスフォード、ミシシッピ州、米国から）。

従って、具体的なエキスのCOX-2阻害活性は、一般的には(a) COX-2ミクロソーム組成物を得る段階；(b) 候補エキスをCOX-2ミクロソーム組成物と混合する段階；及び(c) COX-2活性を阻害する候補エキスの能力を求める段階を含む方法を用いて測定することができる。

COX-2活性は、COX-2のミクロソーム膜標品、例えば、(5~10 mgタンパク質/ml適切な緩衝液中)を得ることにより測定することができる。COX-2分析は、記載されているO₂ 摂取率をモニターすることにより37°Cで行われる(DeWittら, Am. J. Med. 95(2A)40S-44S, 1993; Arch. Biochem. Biophys. 306(1) 96-102, 1993)。この分析は、基本的には、アラキドン酸のプロスタグランジンエンドペルオキシド-2への変換を測定するものである。従って、シクロオキシゲナーゼ活性の1単位は、1ナノモルのアラキドン酸/分の酸素化である(上記DeWittら, 1993)。また、COX-2の活性は、COX-2酵素の産物の量を、例えば、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー等を用いて求めることにより測定することができる。COX-2活性を測定する他の方法は、基質を放射能標識する段階及びCOX-2反応の放射能標識最終産物の量をモニターする段階を用いることである。用いられる方法に無関係に、当業者は、シクロオキシゲナーゼ活性、例えば、使用したO₂/mgシクロオキシゲナーゼ/min; mg産物/mgシクロオキシゲナーゼ/min; μ Ci産生した放射能標識産物/mgシクロオキシゲナーゼ/min; μ Ci使用した放射能標識アラキドン酸塩/mgシクロオキシゲナーゼ/minとして最終測定を表にすることができる。

【0038】

COX-2を阻害することができるフルーツエキスを同定するために、候補エキスを添加していないミクロソーム標品のCOX-2活性を測定又は定量する。次に、候

補エキスを標品に添加し、候補エキスの存在下に活性を再定量する。候補エキ스가存在していないときのアラキドン酸の酸素化に相対して酸素化したアラキドン酸の量が減少することはCOX-2阻害能を有する候補エキスを示している。

COX活性を有する他の阻害剤、例えば、アスピリン、イブプロフェン、Celebrex(登録商標)、ナプロキセン等を用いることができる対照実験を行うことができる。フルーツエキスの結果を有効な既知の阻害剤の存在下のCOX-2活性と比較することにより、相対的活性を求めることができる。

例えば、O₂電極、クロマトグラフィー法(デンシトメトリー又は液体シンチレーション分光法による最終産物の定量)による酸素消費を用いて測定した、アラキドン酸の酸素化の著しい減少は、少なくとも20%~40%のCOX-2活性レベルの低下、最も好ましくは少なくとも約50%の減少によって表され、それより高い値も勿論可能である。アラキドン酸代謝産物を測定するクロマトグラフィー分析とプロスタグランジン形成を測定するCOX酵素分析は、当該技術において周知であり、試験管内又は生体内で行うことができる。

【0039】

フルーツエキスの阻害特性の定量的試験管内試験は、本発明の栄養剤を形成するフルーツエキ스가しばしば全体の果物に天然に見られる同じ化合物であることが一般に認識されているので本発明には要求されない。本明細書に記載されるフルーツエキスのCOX-2阻害成分を形成するアントシアニンとフラボノイド化合物が抗炎症化合物を生じるように摂取時に生体内で更に修飾することができることは理解されるべきである。

同様に、生体内試験も必要なものとして要求されない。しかしながら、当業者は、これらの化合物の生体内活性を試験するために炎症の動物モデルを用いることができる。例えば、上記のような分析で同定されたCOX-2阻害剤の抗炎症作用を試験するために炎症を起こした領域をもつげっ歯類モデルを用いることができる。そのような動物モデルは、使用する分析に用いられ、例えば、少なくとも2匹の動物が同じ炎症をもち、動物の1匹が候補抗炎症組成物と接触させ、もう1匹の動物を抗炎症成分を欠いている注目すべき例外をもつ候補組成物の成分をすべて含む対照又はプラセボ組成物と接触させる。対照又はプラセボ組成物と接触さ

せた動物と比べて候補組成物と接触させた動物の炎症の減少は、抗炎症活性を有する候補組成物を示している。

【0040】

E. アントシアニンと他の抗炎症剤との組合わせ

本発明は、ある態様においては、食物サプリメントの抗炎症活性が天然果実に見られる抗炎症活性より大きいフルーツエキスを含んでいる、抗炎症性を有する食物サプリメントの摂取を記載している。当業者は、そのような食物サプリメントが他の抗炎症剤と有利に組合わせることができることを理解すべきである。そのような追加の抗炎症剤は本発明のフルーツエキスの二次的なものであることは当然のことであり、一般に認識された抗炎症剤であってもよく、実際に上で示した分析を用いて確認されるものであってもよい。

追加の抗炎症剤が既知の抗炎症剤であるか又は本発明を用いて同定されるかに無関係に、本発明は、用いることができる種々の組合わせの使用を企図する。従って、フルーツエキスが『A』であり、その他の抗炎症剤が『B』である場合、組合わせは次のようであってもよい。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【0041】

フルーツエキスと追加の抗炎症剤は、生体内か又は試験管内で細胞に接触又は曝露することができ、細胞のCOX-2活性を阻害する。細胞に加えられる場合の『接触』や『曝露』という用語は、フルーツエキスと第2抗炎症剤が標的細胞に送達され、標的細胞とのすぐ近位にも置かれる方法を記載するために本明細書に用いられている。有益な効果を得るために、両方の物質を、COX-2活性を阻害するのに、炎症を減少させるのに、及びプロスタグランジン又は細胞が位置する個々の患者において炎症応答を減少させるような他の作用を引き起こす炎症の発生を減少させるのに有効な組合わせ量で細胞に送達させることができる。

抗炎症剤は、当業者に周知であり、サリチル酸誘導体(例えば、アスピリン)、パラミノフェノール誘導体(例えば、アセトアミノフェン)、インドール又はイン

デン酢酸(インドメタシン、スリンダク又はエトダラク)、ヘテロアリール酢酸(トルメチンジクロフェナク又はケトロラク)、アリールプロピオン酸誘導体(イブプロフェン、ナプロキセン、ケオプレン、フェノプレン、オキサプロジン)、アントラニル酸(メフェナム酸、メクロフェナム酸)、エノール酸(ピロキシカム、テノキシカム、フェニルブタゾン又はオキシフェンタトラゾン)のような薬剤を含んでいる。これらの及び他の抗炎症剤は、当業者に周知であり、これらの薬剤の説明を更に示すことは必要ではない。

【0042】

F. 製剤

本発明は、食物サプリメントの抗炎症活性が天然果実に見られる抗炎症活性より大きい、フルーツエキスから製造された天然食物サプリメントを提供する。本発明は、粉末、液体、又は固体の形で存在し得るフルーツエキスを提供する。個々の製剤は、下記の実施例に示され、本項には所望される製剤の形と成分が記載され、本発明の教示を考えれば容易に製造される。

フルーツエキスは、例えば、水、ミルク又は他の類似の液体と再構成された場合に、飲料を与え、それを必要としている患者に抗炎症活性を与えるために用いることができる再構成可能な粉末組成物であると思われる。粉末組成物及びそれらから調製される飲料は、多くの注意して設計された製品を様々な形、即ち、シェーク、スープ、果汁入り清涼飲料、スナックバー又はタブレット、ゲルキャップ等の他の固体で利用する疼痛又は炎症管理の計画において患者に、特に長期の治療状態の患者に与えるために疼痛管理期間にわたって混合及び組合わせ得る。

飲料のほかに、本発明のフルーツエキスは、食品に用いることができる。そのようなフルーツエキスは、他の食品と組合わせることができる。例えば、本発明のエキスを含有する油は、調理用油、揚げ油、又はサラダ油として用いることができ、マーガリン、マヨネーズ又はピーナツバターのような油性食品に用いることができる。本発明の化合物で強化した穀物粉は、焼き製品、シリアル、パスタ又はスープのような食品に用いることができる。フルーツエキス及びそれから抽出された新規なアントシアニンを含有する油を乳化し、上記のような飲料ミックスを含む飲料のような種々の水性食品に使用し得る。有利には、そのような食品

を低脂肪、低コレステロール又は制限された食事療法に含めることができる。

【0043】

『栄養剤』は、栄養のため以外の利点を追加する機能食品である。この分類は、栄養飲料、ダイエット飲料（例えば、Slimfast(登録商標)、Boost(登録商標)等）又はスポーツ薬草飲料又は他の強化飲料を含むことができる。本発明は、抗炎症剤として用いることができる栄養剤組成物を提供する。それだけで、関節炎、頭痛、アレルギー疹、炎症性腸症候群、関節痛、慢性疲労、線維筋痛症等を含むがこれらに限定されないCOX-2作用によって仲介される症状を軽減するために使用し得る。

精製したフルーツエキスのほかに、栄養剤又は食品は、必須脂肪酸、ビタミン又はミネラルを含むがこれらに限定されない様々な他の有益な成分を含有することができる。これらの成分は、当業者に周知であるべきであるが、特に製剤又は内容に縛られずに、本項には本発明の食物サプリメントの一部をなすことができる成分を簡単に記載する。栄養サプリメントの内容物と製造を記載している追加の開示は、例えば、米国特許第5,902,797号；同第5,834,048号；同第5,817,350号；同第5,792,461号；同第5,707,657号及び同第5,656,312号に見ることができる（それぞれの明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする）。

【0044】

γ リノレン酸(ω -3)又はリノール酸(ω -6)のような必須脂肪酸は、本発明の食物サプリメントに添加することができる。研究によって、ヒト以外の動物において、n-3とn-6の脂肪酸の比は脂肪酸の絶対量より重要でさえあることがわかった。Boudreau MDら、『アラキドン酸からのエイコサノイド生合成の抑制におけるn-3とn-6脂肪酸の一定比の食品n-3脂肪酸による用量応答の欠除』Am. J. Clin. Nutr. 54:111-117(1991)。必須脂肪酸は、心臓血管の健康や免疫系の補助に関係する。これらの必須脂肪酸の平衡異常によってコレステロール代謝が悪くなり得る。更に、免疫系機能が障害され、炎症を引き起こしてしまう。

カルシウムもマグネシウムも特に骨の健康に関係する。カルシウムとマグネシウム間の平衡異常の起こり得る影響は、骨成長と骨交替（骨の分解と蓄積）に影響し得る骨ミネラルの平衡異常である。マグネシウムもカルシウムと同様に骨の

健康と骨粗鬆症の危険を減少することにより重要であり、これは男性にも女性にも影響を及ぼすものである (Purvis, J.R., 『非インスリン依存性糖尿病における選択心臓血管危険因子に対する経口マグネシウム補充因子の影響』 Archives of Family Medicine 3:503-508(1994)。

【0045】

ミネラルの亜鉛と銅は、共に心臓血管の健康に関係し、5:1の亜鉛:銅比で与えなければならない。これらの2つのミネラルの平衡異常は、銅に対する亜鉛の拮抗作用を引き起こし得る。この作用は、心臓血管の健康を維持する銅の体内使用能を妨害し得る。銅に対して亜鉛が多すぎてもSOD (スーパーオキシドジスムターゼ)、重要な心臓保護酵素の体内製造能が妨害され得る。また、HDL (高密度リポタンパク質) とLDL (低密度リポタンパク質) の適切なバランスを得るために適切な亜鉛:銅比が必要である。典型的な米国男性の亜鉛摂取は、亜鉛を含む食物サプリメントが企図されるようにRDAのわずかに33~75%である。

セレン対ヨウ素の比も、セレン対ヨウ素の比が約2:1が最も効果的に機能する。これらのミネラルは、甲状腺機能に働くので、甲状腺機能の変化による代謝に対する作用が結果として生じる。甲状腺機能の平衡異常によって、食物から栄養素の吸収不良が生じる体内に過度のストレスがかかり得る。これにより、成長と発達が遅れてしまう。

ピリドキシン対葉酸塩対コバラミンの比は、血管障害の予防に最も効果的に機能する。ピリドキシン (ビタミンB6) 対葉酸塩対コバラミン (ビタミンB12) の比は、それぞれ約100:4:1である。これらのビタミンは、潜在的毒性アミノ酸ホモシステインのレベルを下げる能力によって心臓血管機能に働く。この比によって、心臓病の危険のある個体が食事から消費されるこれらのビタミンの平衡異常レベルと不十分なレベルが確認される。

【0046】

更に、ビタミンC、ビタミンB1 (チアミン)、及びビタミンEも与え得る。ビタミンCはスモーカーにおいて増加が要求され、喫煙は肺がんの主な寄与因子である。ビタミンB1は、エネルギー変換に不可欠な役割を果たしている。ニリン酸チアミン (TDP) は、炭水化物のエネルギーへの変換に必要な補酵素である。米国

男性は、現在、総カロリーの約45%を炭水化物から消費しているので、食事におけるビタミンB1最適化が望ましい。

ビタミンB6とともに、ビタミンB12と葉酸の補充は、ホモシステインの血液レベルのモジュレートを援助し、それだけで本発明の食物サプリメント製剤の有効な成分である。ビタミンD（カルシフェロール）は、骨格の形成とミネラルホメオスタシスに不可欠である。ビタミンDがないと、カルシウムがどのくらい吸収に利用できるかに無関係に小腸は十分なカルシウムを吸収することができない。従って、ビタミンDは、強い骨の形成を援助する栄養サプリメントの成分として必要である。

金属酵素マンガンスーパーオキシドジスムターゼ（Mn-SOD）の活性化におけるマンガンの役割は、他の金属酵素系（グルタミシンテターゼ、アルギナーゼ、及びピルビン酸カルボキシラーゼ）における同様の役割とともに明かに確認されている。多くの酵素系は、マンガン金属酵素でないとしてもマンガンの活性化を受けることがわかった。マンガン-SOD結合は特に臨床的に重要であり、この形の金属酵素が細胞のミトコンドリア膜内での唯一の作用形態であり、よってミトコンドリアの保護と体内の酸化エネルギー生産系の安定にユニークな役割を果たすことができるからである。食物サプリメントにマンガンを含めることが望ましい。

【0047】

サプリメントに含めることができる他の微量養分としては、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンE、リボフラビン、ナイアシン、ナイアシンアミド、パントテン酸、ピリドキシン、コバラミン、ビオチン、イノシトール、重酒石酸コリン、ベタイン、又はビタミンKのようなビタミン、又はモリブデン、クロム又はカリウムのようなミネラルが挙げられるがこれらに限定されない。

ストレス、運動、及び他の状態は、体内にフリーラジカルをつくり、体内成分に損傷を生じることがある。フリーラジカルを阻止するために、本発明は、上記ビタミンC及びEのほかに次の抗酸化剤：シトラスバイオフィラボノイド、混合カロテノイド、緑茶エキス、又はN-アセチルシステインを含めることができる。

更に、味をよくするために当業者に周知の他の香料や添加剤を製剤に添加する

ことができる。例えば、製剤はジンジャー、ボスウェリア、果実香料、着色料、防腐剤等を含有することができる。

固体の形で摂取される場合、本発明の栄養剤組成物は、ゼラチンのような固体担体又は補助剤を更に含有することができる。液体の形で投与される場合、水、石油、動物油又は落花生油のような植物由来の油、鉱油、大豆油、又はゴマ油、又は合成油のような液体担体を添加することができる。本発明の栄養剤組成物は、安定剤、防腐剤、緩衝剤、抗酸化剤、又は当業者に既知の他の添加剤を含有することができる。

【0048】

好適実施態様においては、食物サプリメント又は栄養サプリメント又は栄養剤が提供され、約0.1%～約99%、好ましくは約30%～約90%のアントシアニン含有フルーツエキスを含有している。この点で、単一剤形（即ち、単一タブレット、カプセル、サービング（液体にしても固体にしても））は、約1 mg～約500 mgの全アントシアニン、好ましくは約5 mg～約100 mg、更に好ましくは約20 mg～約70 mgの全アントシアニンを含有する。現在好ましい製剤においては、約50 mgの全アントシアニンを含有するタブレット（単一剤形）が提供される。『全アントシアニン』という言葉は、単一剤形中に有するアントシアニンの全量を意味する。

アントシアニン含有植物から得られるエキ스는、ペオニジン、シアニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジン、ペツニジン、マルビジン、ケンフェロール、ヘスペリジン、ゲンチオデルフィン、プラチコニン、シネラリン、それらのグリコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれる。好適実施態様においては、アントシアニンは、シアニジン、ペオニジン、マルビジン、ペツニジン、デルフィニジン、それらのグリコシド誘導体、及びその混合物からなる群より選ばれる。

【0049】

有利には、栄養サプリメントは、COX阻害活性を与える、生体内でアグリコン形に加水分解される安定なアントシアニンを含有する。

好ましい栄養サプリメントは、エルダーベリー、タルトチェリー、ビルベリー

、及びその混合物からなる群より選ばれるフルーツエキスを含有する。更に詳しくは、フルーツエキスは、エルダーベリーエキスをフルーツエキスの約2～約98質量%、タルトチェリーエキスをフルーツエキスの約1～約49質量%、及びビルベリーエキスをフルーツエキスの約1～約49質量%の量で含んでいる。好ましくは、エキスは、約90%～約98%（更に好ましくは約96%）のエルダーベリーエキス、約1～約5%（更に好ましくは約2%）のチェリーエキス（好ましくはタルトチェリー）、約1%～約5%（更に好ましくは約2%）のビルベリーエキスを含んでいる。

この好適栄養サプリメントにおいては、シアニジンがエルダーベリーエキス中に存在する全アントシアニンの少なくとも約90質量%を含んでいる。シアニジンは、エルダーベリーエキス中に存在する全アントシアニンの好ましくは約95質量%、更に好ましくは約96質量%を含んでいる。この点で、シアニジンは、シアニジン-3-グルコシド、シアニジン-3-サンプニグリン、シアニジン-3, 5-ジグルコシド、及びシアニジン-3-サンプ-5-グルコシドの混合物として存在する。

【0050】

同様に、シアニジンは、タルトチェリーエキス中に存在する全アントシアニンの少なくとも約90質量%を含んでいる。シアニジンは、タルトチェリーエキス中に存在する全アントシアニンの好ましくは約95質量%、更に好ましくは約96質量%を含んでいる。エルダーベリーと対照的に、シアニジンは、シアニジン-3-ルチノシドヘキソース、シアニジン-3-ルチノシドペントース、シアニジン-3-ルチノシド、及びペオニジン-3-ルチノシドの混合物として存在する。

最後に、ベルベリーは、マルビジン、ペオニジン、シアニジン、ペツニジン、及びデレフィニジンの混合物を含有する。これらのアントシアニンのそれぞれがビルベリーエキス中に存在する全アントシアニンの約95質量%、更に好ましくは約96質量%を含んでいる。更に詳しくは、マルビジンは、マルビジン-3-アラビノシド、マルビジン-3-グルコシド、マルビジン-3-ガラクトシドとして存在する。ペオニジンは、ペオニジン-3-グルコシド、ペオニジン-3-ガラクトシドとして存在する。シアニジン、ペツニジン、及びデルフィニジンは、3-グルコシドと3-ガラクトシドとして存在する。

次は、特に好ましい実施態様においてそれぞれの個々の内容物を示す表である。

【0051】

果実	アントシアニン	全アントシアニン wt. %
タルトチェリー(バラトン)	シアニジン-3-ルチノシドヘキソース	75%
	シアニジン-3-ルチノシドペントース	3%
	シアニジン-3-ルチノシド	18%
	ペオニジン-3-ルチノシド	4%
合計		100%
エルダーベリー	シアニジン-3-グルコシド	42%
	シアニジン-3-サンプニグリン	43%
	シアニジン-3,5-ジグルコシド	2%
	シアニジン-3-サンプ-5-グルコシド	9%
	不明	4%
合計		100%
ビルベリー	マルビジン-3-アラビノシド	8%
	マルビジン-3-グルコシド	7%
	マルビジン-3-ガラクトシド	3%
	ペオニジン-3-グルコシド	15%
	ペオニジン-3-ガラクトシド	2%
	シアニジン-3-グルコシド	11%
	シアニジン-3-ガラクトシド	8%
	ペツニジン-3-グルコシド	5%
	ペツニジン-3-ガラクトシド	12%
	デルフィニジン-3-グルコシド	12%
	デルフィニジン-3-ガラクトシド	11%
	不明	6%

【0052】

G. 実施例

次の実施例は、本発明の好適実施態様を示すために含まれる。しかしながら、当業者は、本開示を考慮して多くの変更が開示された個々の実施態様において行うことができ、本発明の真意と範囲から逸脱せずに同様の結果を得ることを理解すべきである。

【0053】

実施例 1

100 kgのチェリーをバッグプレスを用いて搾り、果汁を集めた。集めた果汁を200,000分子量区分を有する限外ろ過ユニットによって約38℃未満の温度でろ過した。UFユニットを操作し、保持物質は質量固形分で0.5%未満を有した。

その後、UFユニットからの浸透物を4,000分子量区分を有する膜を用いて逆浸透に供した。保持物質が質量固形分で約1%以下を有するまで逆浸透段階を続ける。

保持物質をタンクに集め、真空蒸発器で約52℃未満の温度において質量固形分で少なくとも20%まで濃縮して濃縮したフラボノイド類の分解を回避した。

濃縮物をバクガデキストリンと合わせ、約27℃未満の温度で維持した噴霧乾燥機の出口温度により噴霧乾燥した。

バッグプレスからの保持したパルプを集め、乾燥し、製粉した。

【0054】

実施例 2

38.8 kgのタルトチェリーからなるバッチをバッグプレスで搾って19.3 kgの果汁と18.6 kgのケーキを得た。pHが3.3の果汁を1770~1950 g/minの流速、1MPa (10 bar) の圧力、ろ過の開始の最初の29℃からろ過の終りの-7.8℃ (18°F) の範囲内の温度で限外ろ過膜までポンプで送った。ジフィルトレートフローを開始させ、浸透物中の溶解した固形分が約0.2質量%になるまで続けた。

限外ろ過膜は、100,000分子量 (ダルトン) 区分が評価されたPVDF高分子膜とした。適切な膜をPCIメンブランシステムズから商品名FPとして入手し得る。

限外ろ過の終りに、質量固形分で5%を有する53.7 kgの浸透物と質量固形分で0.3%を有する3.49 kgの保持物質を集めた。次に、浸透物を4MPa (40 bar) のフィード圧、最初の1290 g/min~終りの1380 g/minの範囲の流速、プロセスの開始

時に24℃でプロセスの完了時に5℃ (41°F) の温度でナノろ過/逆浸透に供した。
72.4 kgの水のジフィルトレートを用いた。

4,000分子量 (ダルトン) 区分を有するポリエーテルスルホン膜を用いた。適切な膜をPCIメンブランシステムズから商品名ES404として入手し得る。

この工程の完了時に6.4 kgの保持物質を集め、質量固形分で1%を有した。質量固形分で2%を有する117 kgの浸透物を回収した。

粉末を製造するために、保持物質を合わせ、79 gのパクガデキストリンM100と混合し、得られた生成物を入口温度が約140℃で出口温度が約190℃の噴霧乾燥機へ導入し、約105 gの粉末を製造した。

【0055】

実施例3

フルーツエキスのCOX-2とCOX-1阻害活性の比較

本実施例には、フルーツエキスのCOX阻害活性をモニターする酸素モニタリングシステムを用いた酵素分析が記載される。この分析においては、溶存酸素の濃度変化が溶存酸素測定システム (インステック、プリマスミーディング、ペンシルベニア州) の酸素電極により連続的にモニターされる。リニアレコーダー (フィッシャサイエンティフィック、ピッツバーグ、ペンシルベニア州) で出力を記録する。

毎日新しい塩化カリウム溶液 (15 g/100 ml蒸留水) をつくり、製造業者の説明書に従って電極を設定した。チャンバを37℃に保った。

【0056】

プロスタグランジン分析キットを用い、COX-1分析と同様の方法で分析を設定した。概要としては、37℃に1分間温めた20 mlの100 mMトリス緩衝液 (ワーキングバッファー) に50 μ lのフェノールを添加した。ヘマチンチューブに0.9 mlのワーキングバッファーを添加した。アラキドン酸バイアルに50 μ lの0.1 NaOHを添加し、攪拌した。0.43 mlの水を添加し、その溶液を混合した。試料のエキスの質量を量り、ワーキングバッファーに0.1 g/mlの最終濃度に溶解した。バッファー、試料又は希釈試料を酵素分析に直接用いた。

当業者に周知であるはずである酵素分析は、製造業者の説明書に従って行われ

る。概要としては、閉じた注入バルブをもつオーバーフロー出口と、右向きにシリンジに接続された主出口からチャンバへ600 μ lのワーキングバッファーを流した。1分間隔で、5 μ lの酵素、15 μ lのヘマチン溶液、6 μ lのバッファー又は試料又は希釈試料及び8 μ lのアラキドン酸溶液を注入した。酸素濃度変化をmVに変換し、記録した。アラキドン酸を添加したとき、酸素の消費又は酸素濃度の低下が明らかであった。

下記の表に示されるように試験した試料の中で選択性の傾向が明かであった。

【0057】

表1 COX-1とCOX-2のIC50値及び比活性

試料	COX-1 IC50	COX-2 IC50	比活性*
アスピリン	1/20,000	1/10,000	0.5
モントモランシータルトチェリープライマー	1/20,000	無効	NA
バラトントタルトチェリープライム	1/5,000	1/23,000	4.6
ミルネタルトチェリー	1/2,500	無効	NA
アルテミスブルーベリー	>>1/1,000	1/10,000	NA
アルテミスチョークベリー	1/2,000	1/15,000	7.5
アルテミスエルダーベリー	1/3,000	1/23,000	10.1
ニュートリライトアセロラチェリー	1/20,000	無効	NA
セレブレックス	1/4,000	1/28,000	7
ケルセチンスタンダード	1/3,500	1/22,000	6.3
アルテミスビルベリー	1/12,000	1/15,000	1.25

* この数字が大きいほどCOX-1とは反対にCOX-2に対するエキスの選択性が大きくなる。

更に、周知のCOX-2特異的阻害剤のセレブレックスに関してCOX-2の効力をモニターした。

【0058】

表2 セレブレックスに相対するCOX-2の効力

上記方法を用いて種々の阻害剤候補物質のCOX-2を求め、既知のCOX-2阻害剤のセレブレックスと比較した。

試料	COX-2	効力 セレブレックスとの比較
アルテミスチョークチェリー	1/15,000	54%
アルテミスエルダーベリー	1/23,000	82%
アルテミスブルーベリー	1/10,000	36%
バラトントルトチェリープライム	1/23,000	82%
ケルセチンスタンダード	1/22,000	78%
セレブレックス	1/28,000	100%

データからアルテミスダークチェリー試料のCOX-2に対する選択性が明らかである。

【0059】

実施例4

阻害剤候補物質がCOX-1か又はCOX-2を阻害するかを求める現在好ましい方法を次に述べる。COX-1とCOX-2双方の酵素反応について6種類の異なる濃度を用いる。標準、又は酵素反応からのPG-f2 α の含量を免疫分析により定量する。標準のPG-f2 α の量を用いて標準曲線（光学濃度と濃度）をつくり、その標準曲線を用いて試料の各酵素反応におけるPG-f2 α 量（回帰）を算出する。次に、同じ阻害剤候補物質の6種類の異なる反応濃度からPG-f2 α の含量を用いて試料曲線をつくる。最後に、酵素を最大活性（阻害剤を含まない）の50%まで阻害する阻害剤候補物質の濃度、又はIC₅₀を試料曲線から得る。一貫した結果を維持するために、各組の実験に正の対照として阻害剤候補物質又は薬剤を用いる。

COX-1とCOX-2の酵素はケンタッキー大学のダニエルタイ博士から入手した。次のように調製した。ケンタッキー中央血液センターから入手したヒト血小板濃縮物からCOX-1酵素を抽出した。血小板浮遊液を1,000×gで10分間遠心分離した。沈降物を同量のリン酸塩緩衝食塩水で洗浄し、浮遊液を更に遠心分離した。血小

板を5容量の50 mMトリスHCl緩衝液、pH7.5に懸濁し、4°Cで3×20秒間音波処理した。浮遊液を5,000×gで10分間遠心分離した。上清を更に100,000×gで60分間遠心分離した。沈降物（ミクロソーム）を5 mlの50 mMトリスHCl緩衝液、pH7.5に懸濁し、-80°Cで200 μ lのアリコートに貯蔵した。この画分をCOX-1酵素源として用いた。

【0060】

COX-2cDNAを有する組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞（Sf9）から組換えヒトCOX-2酵素を得た。概要としては、Sf9細胞（ 1×10^7 ）を75 cm² 組織培養フラスコ中の20 mlのTNF-FH完全培地に播種した。細胞を1時間付着させた。培地を除去し、多重度約10の組換えウイルスを含有する4mlのグレース培地を添加した。細胞を72時間連続して増殖させた。500×gで10分間遠心分離により細胞を集めた。次に、細胞を1 mlの50 mMトリスHCl、pH7.5緩衝液に懸濁し、0°Cで3×10秒間音波処理した。ホモジネートを5,000×gで5秒間簡単に回転させて細胞デブリを除去した。次に、上清を-80°Cで200 μ lのアリコートに貯蔵した。この画分をCOX-2酵素源として用いた。

【0061】

次の緩衝液を調製した。

1. コーティングバッファー: 0.1 M NaHCO₃/Na₂CO₃, pH9.5
2. 酵素免疫分析（『EIA』）緩衝液: 0.9%NaCl及び0.1%ウシ血清アルブミン（ELISA又はRISグレード）を含有する0.1 M KH₂PO₄/K₂HP0₄, pH7.5
3. 抗体安定化緩衝液: EIA緩衝液＋スクロース（5 g/100ml）
4. 洗浄緩衝液: 0.05%トウイーン20
5. 酵素反応緩衝液及び試料希釈緩衝液: 50 mMトリス-HCl、pH7.5
6. PBS（リン酸塩緩衝食塩水）0.9%NaClを含有する10 mM KH₂PO₄/K₂HP0₄、pH7.5
7. プロテインA溶液 1 mg/ml PBS

(a) 100 μ lプロテインA溶液を19.9 mlコーティングバッファーに添加し、十分に混合し、分配トレイに注入し；(b) 200 μ lを各ウェルにピペットで注入し（ウェルに送る前に何回もすすぐ）；(c) プレートを室温で4～5時間又は37°Cで2～3

時間又は4℃で一晩貯蔵し；(d) 100 μ l のEIA緩衝液を各ウェルにピペットで注入して充填されていない場所を塞ぎ、振盪し、室温で2時間又は4℃で一晩インキュベートすることにより、免疫分析のウェルを被覆した。ウェルに水を供給する場合にはプレートを4℃で無期限に貯蔵し得る。

【0062】

次の溶液を調製した。

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| 1. アラキドン酸： | 1 mg/ml エタノール |
| 2. イソプロテレノール： | 2.5 mg/ml、用時調製 |
| 3. ヘモグロビン： | 3.2 mg/ml、用時調製 |
| 4. SnCl_2 ： | 50 mg/ml エタノール |
| 5. HCl | 1 N |
| 6. Kブルー基質緩衝液： | ネオジーン、レキシントン、ケンタッキー州 |
| 7. COX-1酵素(上記の通り)： | 30倍に希釈、5 μ l/分析を使用 |
| 8. COX-2酵素(上記の通り)： | 5倍に希釈、5 μ l/分析を使用 |
| 9. PGF-2 α 抗体(タイ博士) | 5,000 \times に希釈、50 μ l/ウェルを使用 |
| 10. PGF-2 α -HRP(タイ博士) | 2,000 \times に希釈、100 μ l/ウェルを使用 |

次のPGF-2 α を調製した。

- A. 1 μ g/ml
- B. 20 μ l A (1 μ g/ml) + 980 μ l EIA緩衝液-----1,000 pg/50 μ l
- C. 200 μ l B + 1.8 ml EIA緩衝液-----100 pg/50 μ l
- D. 200 μ l C + 1.8 ml EIA緩衝液-----10 pg/50 μ l

【0063】

標準 (pg/50 μ l/ウェル)	B	C	D	緩衝液 (ml)
0				1.0
5			0.5	0.5
10			1.0	
20		0.2		0.8
50		0.5		0.5
100		1.0		
200	0.2			0.8
500	0.5			0.5
1000	1.0			

【0064】

阻害剤候補物質がアントシアニン含有植物のエキスである場合、アントシアニンを抽出し、濃縮し、加水分解してアグリコン形、例えば、アントシアニジンを得た。同様に、阻害剤候補物質が市販のエキスである場合、エキスを加水分解してアグリコン形を得た。それぞれの場合において、試験されるアントシアニンのアグリコン形であった。次に、加水分解したアントシアニンを試験のためにメタノール中0.1% HClに溶解した。

PGF-2 α はプロスタグランジンであり、阻害剤候補物質がCOX-1か又はCOX-2（用いられる酵素に左右される）を効果的に阻害するかを求めるために酵素反応が行われる。PGF-2 α は、酵素反応によって形成されたプロスタグランジン産物から減少した間接的な安定なプロスタグランジンである。

酵素反応手順は次のように行った。(a) 385 μ lの緩衝液（50 mM トリス-HCl、pH 7.5）を調製し、50 μ lのイソプロテレノール、10 μ lのヘモグロビン、5 μ lのSnCl₂、及び5 μ lの酵素（試験すべき酵素、例えば、上記COX-1又はCOX-2に左右される）と室温で混合し；(b) 455 μ lの混合液(a)を40 μ lの阻害剤候補物質を有するチューブ、ミックスに添加し；(c) 5 μ lのアラキドン酸溶液を各チューブ、ミックス

スに添加し、37°Cで5分間インキュベートし；(d) 30 μ lの1N HClを添加し混合することにより反応を停止させ；(e) 30 μ lの1Mトリス塩基を添加することにより中和した。

【0065】

酵素免疫分析手順は、酵素反応によって生成したPGF-2 α の量を測定する方法である。酵素免疫分析を次の方法で行った。(a) ウェル中の液体全部を振ってペーパータオルにブロットし；(b) 200 μ lの洗浄緩衝液で2回洗浄し、振ってブロットし；(c) 50 μ lのPGF-2 α 抗体を添加し；(d) 50 μ l STD (PGF-2 α) 又は上の酵素反応産物 (EIA緩衝液で50Xに希釈した)；(e) 100 μ lのPGF-2 α -HRP (EIA緩衝液中)；(f) 振盪し、プレート室温で1時間放置し；(g) 工程(b)を繰り返すことによりウェルを3回洗浄し；(h) 100 μ lの基質緩衝液を各ウェルに添加し；(i) 発色によって3~30分間室温でインキュベートし；(j) コンピュータと96ウェルバイオアッセイリーダーをつけ、操作説明書に従い (モレキュラーデバイシーズ、Vmax速度論的マイクロプレートリーダー)；(k) 30 μ lの1N HClを添加して反応を終了させ；(l) 420 nmで読取り；(m) データを記録する。

(a) データをスプレッドシートにコピーし、(b) 標準PGF-2 α 免疫分析結果に従って標準曲線を作り；(c) 標準曲線からの回帰を用いてすべての試料酵素反応におけるPGF-2 α を見出し；(d) 各試料の曲線を描き；(e) IC₅₀を求めることによりデータを分析する。この手順に従って、数種の阻害剤候補物質を評価し、結果を下記表3に示す。

【0066】

表3

試料	試料質量 (g)	精製 後の 最終 容量 (ml)	全アントシア ニジンの濃度 (mg/ml)	シアニ ジンの濃度 (mg/ml)	シア ニジ ン (%)	CPX阻害 (加水分解した液体試料)		
						IC ₅₀ (COX1) (μ g)	IC ₅₀ (COX2) (μ g)	IC ₅₀ (COX1) / IC ₅₀ (COX2)
A	1.33	2.1	1.53	0.93	61	13.2	10.7	1.2
B	0.15	2.0	1.68	0.74	44	19.2	21.4	0.9
C	0.15	2.0	2.92	1.36	47	8.7	8.7	1.0
D	0.2028	1.0	0.20	0.20	100	34.4	17.5	2.0
E	0.15213	1.0	0.17	0.17	100	31.5	15.8	2.0
F	0.30784	1.0	0.057	0.046	80	32.8	23.5	1.4
アスピリン						100	100	1
イブプロ フェン						8	2	4
セレブレ ックス						7	1	7
ビオックス						10	0.5	20

Aは7%のアントシアニンを含む40%ビルベリーを含むタブレットである。

Bは25%ビルベリーを含むニュートリテック製の市販のエキスである。

Cは試料Bと異なる製造ロットからの25%ビルベリーを含むニュートリテック製の15%がアントシアニンである39.17%のエルダーベリーを含むタブレットである。

Eは20%がアントシアニンである39.1%のエルダーベリーを含むタブレットである。

Fは15%がアントシアニンである11.76%のエルダーベリー及び7.2%がアントシアニンである19%のビルベリーを含むタブレットである。

エルダーベリーの98%がシアニンとその配糖体である。ビルベリーの23%がシアニンとその配糖体である。

上記から高いシアニン含量が効力と選択性を高めることは明かである。

【0067】

実施例5

上記実施例4に記載された手順に従って、多くの阻害剤候補物質を評価した。
表4に結果を示す。

【0068】

表4

エキス	IC ₅₀ COX-1	IC ₅₀ COX-2	選択性	活性成分の含量
ビルベリー(アルテミス製)*	29	22	1.3	10.0%
ルビニ(アルテミス製)*	75	57	1.2	7.2%
エルダーベリープロト	18	14	1.3	21.0%
ビルベリー(イプロナ)*	41	34	1.2	2.3%
チョークベリー(イプロナ)*	117	97	1.2	13.6%
エルダーベリー(イプロナ製)*	47	35	1.3	17.0%
ビルベリー(ニュートラテック製)*	14	10	1.4	10.6%
タルトチェリー01-01a*	250	200	1.3	3.48%
エルターベリー004-03*(23%CRR)	25	19	1.3	15.06%
エルダーベリー004-04*(0%CRR)	18	14	1.3	20.15%
プロメグラネートエキス粉末	120	80	1.5	n/a
ツメリックエキス	250	150	1.7	
ボスウェリアセラタ	200	150	1.3	
パナキシゴトジンセンゲ	200	250	0.8	
ジンジャー	200	100	2	
緑茶エキス末	70	60	1.2	
緑茶ポリフェノール	110	100	1.1	

注: 1. 全アントシアニン は果実試料全部のシアニジン-3-グルコシドとして定量する。

2. 活性成分の含量は試験結果と活性化合物の%に基づいて計算する。例えば、エルダーチェリー、チョークベリー又はタルトチェリー中の100%のアントシ

アニンは活性物質シアニン配糖体である。

* はCOX阻害活性が加水分解しXADカラム精製した果実から試験されることを意味する。

上記結果によれば、炎症治療用食物サプリメントのCOX-1阻害とCOX-2阻害は、少なくとも1、好ましくは1.3より大きい。結果として食物サプリメントはCOX-2を選択的に阻害する。

【0069】

製剤

本実施例は、抗炎症剤として用いられるアントシアニン含有植物からのフルーツエキスを1種以上含有する製剤を示すものである。これらは単に例示製剤であり、これらの製剤が具体的な説明に従って変更することができ、本発明の製剤と等価のままであることを当業者は理解するであろう。

【0070】

表5 抗炎症製剤1

成分	2単位製剤	1単位製剤	製剤%
活性成分:			
エルダーベリーエキス (最少値7%アントシアニン)	100 mg	50 mg	11.277%
チョークベリーエキス 最少値10%アントシアニン	100 mg	50 mg	11.277%
タルトチェリーエキス	5.00 mg	2.50 mg	0.564%
賦形剤:			
ライスパウダー	675.00 mg	337.5 mg	76.121%
ステアリン酸マグネシウム	4.50 mg	2.25 mg	0.507%
二酸化ケイ素	2.25 mg	1.13 mg	0.254%

【0071】

表6 抗炎症製剤2

成分	2単位製剤	1単位製剤	製剤%
活性成分:			
エルダーベリーエキス (最少値13%アントシアニン)	100 mg	50 mg	11.855%
チョークベリーエキス 最少値10%アントシアニン	100 mg	50 mg	11.855%
タルトチェリーエキス	5.00 mg	2.50 mg	0.593%
他の抗炎症性薬草エキス: ボスウェリア・セラタエキス (最少値65%ボズウェル酸)	600.00 mg	300.00 mg	71.132
賦形剤:			
ライスパウダー	25.00 mg	12.50 mg	2.964%
ステアリン酸マグネシウム	9.00 mg	4.50 mg	1.067%
二酸化ケイ素	4.50 mg	2.25 mg	0.533%

【0072】

表7 抗炎症製剤2

成分	2単位製剤	1単位製剤	製剤%
活性成分:			
エルダーベリーエキス (最少値13%アントシアニン)	100 mg	50 mg	5.905%
チョークベリーエキス 最少値10%アントシアニン	100 mg	50 mg	5.905%
タルトチェリーエキス	5.00 mg	2.50 mg	0.295%
他の抗炎症性薬草エキス: ボスウェリア・セラタエキス (最少値65%ボズウェル酸)	600.00 mg	300.00 mg	35.430%
ジンジャーエキス (最少値5%ジンゲロール)	500.00 mg	125.00 mg	29.525%
賦形剤:			
ライスパウダー	375.00 mg	93.75 mg	22.143%
ステアリン酸マグネシウム	9.00 mg	2.25 mg	0.531%
二酸化ケイ素	4.50 mg	1.13 mg	0.266%

【0073】

本明細書に開示され特許請求された組成物及び/又は方法はすべて本開示を考慮して過度に実験することなく行われ得る。本発明の組成物及び方法を好適実施

態様によって記載してきたが、本発明の概念、真意及び範囲から逸脱することなく本明細書に記載された組成物及び/又は方法及び工程又は工程順序に変更を加えることができることは当業者に明かである。特に、本明細書に記載される物質を化学的及び生理的双方に関係するある種の物質に置き換えることができるとともに同じ又は類似した結果が得られることは明かである。当業者に明かなそのような類似の置換や変更はすべて前記特許請求の範囲によって定義される本発明の真意、範囲及び概念内にあると考えられる。

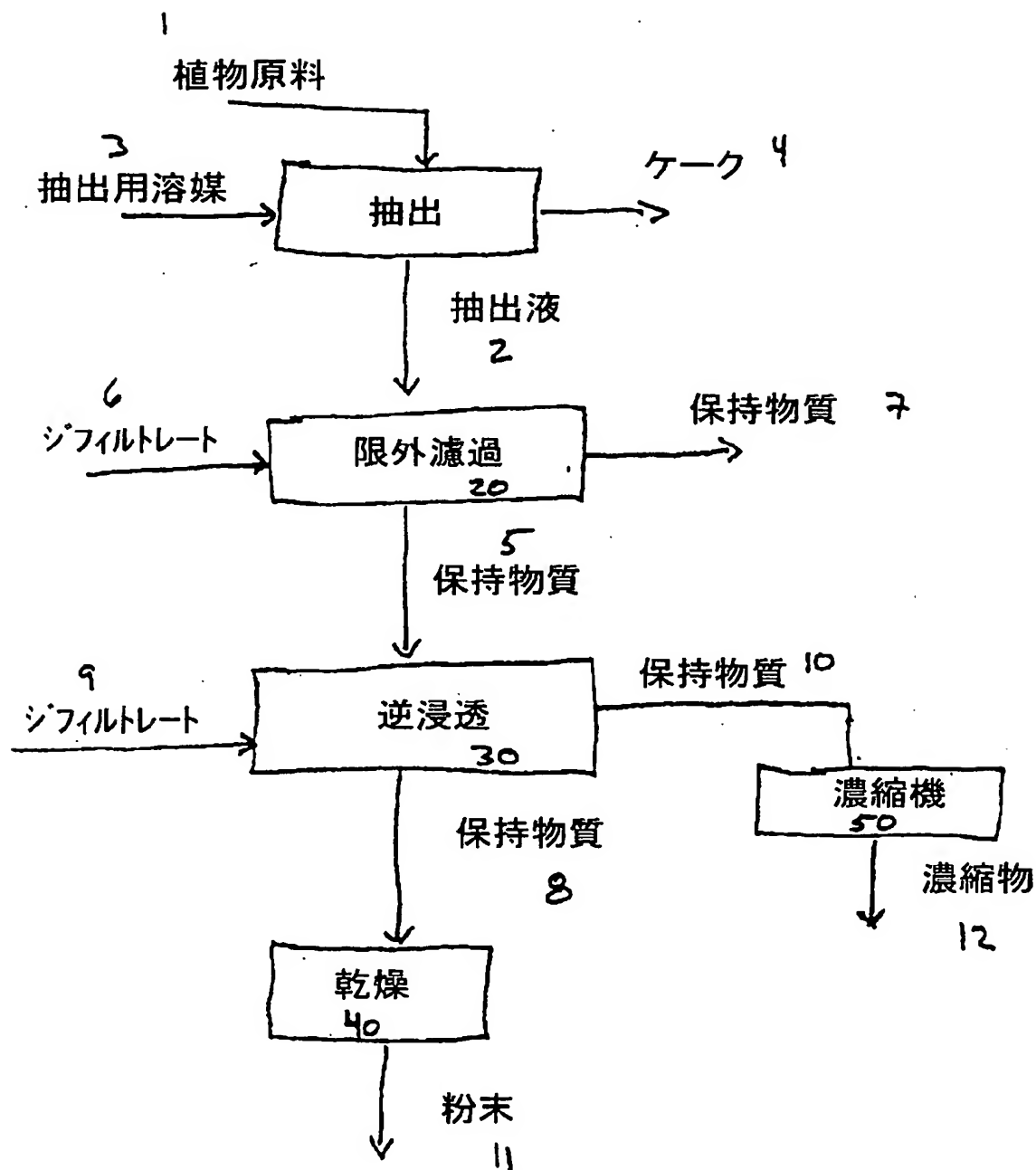
【図面の簡単な説明】

【図1】

アントシアニン含有植物から望ましいアントシアニンを獲得及び濃縮する方法の実施態様を示すフローシートである。

【図1】

FIG. 1



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A23L1/30 A61K35/78 C07H17/065		International Application No. PCT/US 00/23423
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A23L A61K C07H B01D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, FSTA, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X A	WO 00 33824 A (UNIV MICHIGAN ;BOOREN ALDEN M (US); GRAY JAMES I (US); WANG HAIBO) 15 June 2000 (2000-06-15) claims 1-18; figures 5,7-10; examples 1,2,4-6 page 1, line 4-8 page 4, line 2 -page 5, line 32 page 9, line 27 -page 11, line 12 page 11, line 23 -page 13, line 8 --- -/-	1-3, 5, 7-12 4, 6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 December 2000		Date of mailing of the international search report 18 -01- 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tallgren, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/23423

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG ET AL: "ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY COMPOUNDS IN TART CHERRIES (ANTHOCYANINS, PHENOLICS, FLAVONOIDS, BALATON, MONTMORENCY)" DISSERTATION ABSTRACT, XP002137469	1-3, 5, 7, 9, 10
A	& WANG HAIBO: "ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY COMPOUNDS IN TART CHERRIES (ANTHOCYANINS, PHENOLICS, FLAVONOIDS, BALATON, MONTMORENCY)" 1998, DISSERTATION, MICHIGAN STATE UNIVERSITY, EAST LANSING, MI, USA	4, 6, 8, 11, 12
X	US 4 376 781 A (LIETTI ANDREA ET AL) 15 March 1983 (1983-03-15) claims 1, 8; examples 1, 2 column 1, line 6-15, 53 -column 2, line 18 column 5, line 32-49 column 15, line 50 -column 17, line 20	1, 2, 7-12
X	US 4 258 055 A (LIETTI ANDREA ET AL) 24 March 1981 (1981-03-24) examples 1-3	1, 2, 7-12
X	DELLA LOGGIA R ET AL: "ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF BENZOPYRONES THAT ARE INHIBITORS OF CYCLOOXYGENASE AND LIPOXYGENASE" PHARMACOLOGICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 20, no. SUPPL. 5, 1988, pages 91-94, XP000971680 ISSN: 0031-6989	1, 3
A	page 91, paragraphs 1, 2 -page 94, paragraph 3; table 1	2, 4-11
A	US 4 083 779 A (COMBE PIERRE ET AL) 11 April 1978 (1978-04-11) claims 1, 2, 5, 7-; figure 1; example 1 column 1, line 7-15, 46-65 column 2, line 37-42, 65 -column 3, line 39	23-25
A	US 4 925 690 A (ODAKE YOSHINOBU) 15 May 1990 (1990-05-15) claims 1-7; examples 1, 2 column 1, line 48-66 column 2, line 26 column 3, line 8, 25-37	23-25

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International Application No PCT/US 00/23423
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 211 577 A (WALLIN BRUCE K) 8 July 1980 (1980-07-08) cited in the application claims 1,4,6-8,13,14,19-21; figure 1; examples 1,5,6 column 4, line 44-68 column 9, line 25-31	1,2,9, 10,23-25
A	WOO A H ET AL: "ANTHO CYANIN RECOVERY FROM CRANBERRY VACCINIUM-MACROCARPON PULP WASTES BY MEMBRANE TECHNOLOGY" JOURNAL OF FOOD SCIENCE, vol. 45, no. 4, 1980, pages 875-880, XP000971709 ISSN: 0022-1147 page 875, paragraph 5; figure 7; table 1 page 876, paragraphs 1,2 -page 877, paragraph 1 page 878, paragraph 2 -page 879, paragraph 1	23-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/US 00/23423**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13-22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements, to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/23423

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0033824 A	15-06-2000	AU 2172100 A AU 2175400 A AU 2358400 A WO 0033667 A WO 0033670 A US 6150408 A	26-06-2000 26-06-2000 26-06-2000 15-06-2000 15-06-2000 21-11-2000
US 4376781 A	15-03-1983	NONE	
US 4258055 A	24-03-1981	GB 1589294 A BE 858522 A DE 2740346 A ES 462175 A FR 2364030 A GR 61176 A JP 1648488 C JP 3014286 B JP 60011416 A JP 1275525 C JP 53062838 A JP 59053883 B PT 67009 A,B US 4413004 A	13-05-1981 02-01-1978 09-03-1978 01-11-1978 07-04-1978 03-10-1978 13-03-1992 26-02-1991 21-01-1985 31-07-1985 05-06-1978 27-12-1984 01-10-1977 01-11-1983
US 4083779 A	11-04-1978	FR 2318908 A CH 616175 A DE 2633068 A ES 449970 A GB 1555239 A IT 1075017 B JP 1228541 C JP 52021032 A JP 58050633 B NL 7607896 A,B	18-02-1977 14-03-1980 16-06-1977 16-08-1977 07-11-1979 22-04-1985 19-09-1984 17-02-1977 11-11-1983 25-01-1977
US 4925690 A	15-05-1990	JP 1067173 A	13-03-1989
US 4211577 A	08-07-1980	AU 524281 B AU 3976478 A CA 1126265 A CH 638554 A DE 2839502 A ES 473270 A FR 2402686 A GB 2006802 A,B IT 1107692 B JP 54053141 A JP 60031225 B NL 7809319 A,B PT 68536 A YU 215578 A	09-09-1982 20-03-1980 22-06-1982 30-09-1983 22-03-1979 16-04-1979 06-04-1979 10-05-1979 25-11-1985 26-04-1979 20-07-1985 15-03-1979 01-10-1978 30-04-1983

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	特コード (参考)
A 6 1 K	9/20 9/48 35/78	A 6 1 K 9/20 9/48 35/78	C H K
A 6 1 P	1/00 11/06 17/00 19/02 25/04 29/00 37/08 43/00	A 6 1 P 1/00 11/06 17/00 19/02 25/04 29/00 37/08 43/00	1 1 1
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ , CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG , ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, C A, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM , DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, K E, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS , LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, R U, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM , TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72) 発明者	ワン ハイボ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 93720 フレスノ イースト オーク ア ベニュー 2203		
(72) 発明者	ダウィット ディヴィッド エル アメリカ合衆国 ミシガン州 48864 オ ークモス ヒューレット 4311		
(72) 発明者	クレンピン ディヴィッド ダブリュー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92591 テメキューラ コート コンテラ 30150		
(72) 発明者	キアン ヨン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92126 サン ディエゴ ハーリントン ドライブ 8843		

(72)発明者 モーディ デュバック ケイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
92592 テメキューラ コート リアルト
43391

Fターム(参考) 4B018 LB10 LE03 MD52 ME14 MF01
MF06
4C076 AA09 AA22 AA29 AA36 AA53
BB01 CC01 CC04 CC29
4C086 AA01 AA02 EA11 MA02 MA04
MA23 MA28 MA35 MA37 MA52
NA14 ZA08 ZA59 ZA66 ZA89
ZA96 ZB11 ZB13
4C088 AB12 AB51 AB56 AB62 AC04
BA08 CA11 CA17 MA02 MA23
MA35 MA37 MA43 MA52 NA14
ZA08 ZA59 ZA66 ZA89 ZA96
ZB11 ZB13

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.